UNIVERSITÉ DE CAEN

FACULTÉ DES SCIENCES

THÈSES

présentées à la Faculté des Sciences de l'Université de Caen
pour obtenir le grade de Docteur ès-sciences naturelles

par

Marc MOURARET

1re THÈSE

Contribution à l'étude de l'activité des enzymes du sol : l'asparaginase

2e THÈSE

La technique des anticorps fluorescents et ses applications à la microbiologie

présentées et soutenues le 1er Juillet 1965

JURY

M. JACQUET, Président
MM. BINET, KAUFFMANN, Suffragants

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE CAEN

PROFESSEURS

MM.	LOZAC'H	*Doyen*, Professeur (Chimie).
	DANGEARD	Professeur (Géologie).
	SCHERER	Professeur (Physique Générale).
	APERY	Professeur (Mathématiques pures).
	JACQUET	Professeur (Microbiologie).
Mme	WALTER-LEVY	Professeur (Chimie).
MM.	PITOT	Professeur (Botanique).
	CAMPBELL	Professeur (Mécanique rationnelle).
	VIALLE	Professeur (Chimie).
	COJAN	Professeur (Physique).
	PALLU de la BARRIÈRE	Professeur (Mathématiques).
	PHAM	Professeur (Mathématiques).
	GIACOMO	*Assesseur*, Professeur (Physique).
	MONIER	Professeur (Minéralogie).
	CONIA	Professeur (Chimie).
	PAREYN	Professeur (Géologie).
Mme	GAYRAL	Professeur (Botanique).
MM.	ROMANET	Professeur (Chimie Générale).
	BINET	Professeur (Botanique).
	THUREAU	Professeur (Physique).
	NATAF	Professeur (Mathématiques).
	PINAZZI	Professeur (Chimie).
	RYBAK	Professeur (Physiologie animale).
	LUBET	Professeur (Zoologie).
	DOGUET	Professeur sans chaire (Biologie végétale).
	MABBOUX-STROMBERG	Professeur sans chaire (Physique).
	BERNARD Maurice	Professeur sans chaire (Chimie)
	BARRAT	Professeur sans chaire (Physique).
	LEGROS	Professeur sans chaire (Physique).
	GAULT	Professeur sans chaire (Chimie).
Mlle	DEMEUSY	Maître de Conférences (Biologie).
MM.	MOLLIER	Maître de Conférences (Chimie).
	KAUFFMANN	Maître de Conférences (Microbiologie).
	CACHON	Maître de Conférences (Zoologie).
Mme	BLANCHETON	Maître de Conférences (Mathématiques).
MM.	DESCHANVRES	Maître de Conférences (Chimie).
	THUILLIER	Maître de Conférences (Chimie).
	SIGNORET	Maître de Conférences (Zoologie).
	MERCOUROFF	Maître de Conférences (Physique).
	PONS	Maître de Conférences (Physique appliquée).
	FORTINI	Maître de Conférences (Electronique).
	HERVE	Maître de Conférences (Mécanique appliquée).
	LEHMANN	Maître de Conférences (Physique).
	BERNARD Jean	Maître de Conférences (Mathématiques).
	BOULET	Maître de Conférences (Psychophysiologie).
	GHOUILA-HOURI	Maître de Conférences (Mathématiques M.P.C.).
Mme	GRANLET	Maître de Conférences (Mathématiques M.P.C.).
M.	CAUCAL	*Conseiller Administratif, Chef des Services Administratifs de la Faculté des Sciences.*

UNIVERSITÉ DE CAEN

FACULTÉ DES SCIENCES

THÈSES

présentées à la Faculté des Sciences de l'Université de Caen
pour obtenir le grade de Docteur ès-sciences naturelles

par

Marc MOURARET

1re THÈSE

Contribution à l'étude de l'activité des enzymes du sol : l'asparaginase

2e THÈSE

La technique des anticorps fluorescents et ses applications à la microbiologie

présentées et soutenues le 1er Juillet 1965

JURY

M. JACQUET, Président
MM. BINET, KAUFFMANN, Suffragants

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE CAEN

PROFESSEURS

MM.	LOZAC'H	*Doyen*, Professeur (Chimie).
	DANGEARD	Professeur (Géologie).
	SCHERER	Professeur (Physique Générale).
	APERY	Professeur (Mathématiques pures).
	JACQUET	Professeur (Microbiologie).
Mme	WALTER-LEVY	Professeur (Chimie).
MM.	PITOT	Professeur (Botanique).
	CAMPBELL	Professeur (Mécanique rationnelle).
	VIALLE	Professeur (Chimie).
	COJAN	Professeur (Physique).
	PALLU de la BARRIÈRE	Professeur (Mathématiques).
	PHAM	Professeur (Mathématiques).
	GIACOMO	*Assesseur*, Professeur (Physique).
	MONIER	Professeur (Minéralogie).
	CONIA	Professeur (Chimie).
	PAREYN	Professeur (Géologie).
Mme	GAYRAL	Professeur (Botanique).
MM.	ROMANET	Professeur (Chimie Générale).
	BINET	Professeur (Botanique).
	THUREAU	Professeur (Physique).
	NATAF	Professeur (Mathématiques).
	PINAZZI	Professeur (Chimie).
	RYBAK	Professeur (Physiologie animale).
	LUBET	Professeur (Zoologie).
	DOGUET	Professeur sans chaire (Biologie végétale).
	MABBOUX-STROMBERG	Professeur sans chaire (Physique).
	BERNARD Maurice	Professeur sans chaire (Chimie)
	BARRAT	Professeur sans chaire (Physique).
	LEGROS	Professeur sans chaire (Physique).
	GAULT	Professeur sans chaire (Chimie).
Mlle	DEMEUSY	Maître de Conférences (Biologie).
MM.	MOLLIER	Maître de Conférences (Chimie).
	KAUFFMANN	Maître de Conférences (Microbiologie).
	CACHON	Maître de Conférences (Zoologie).
Mme	BLANCHETON	Maître de Conférences (Mathématiques).
MM.	DESCHANVRES	Maître de Conférences (Chimie).
	THUILLIER	Maître de Conférences (Chimie).
	SIGNORET	Maître de Conférences (Zoologie).
	MERCOUROFF	Maître de Conférences (Physique).
	PONS	Maître de Conférences (Physique appliquée).
	FORTINI	Maître de Conférences (Electronique).
	HERVE	Maître de Conférences (Mécanique appliquée).
	LEHMANN	Maître de Conférences (Physique).
	BERNARD Jean	Maître de Conférences (Mathématiques).
	BOULET	Maître de Conférences (Psychophysiologie).
	GHOUILA-HOURI	Maître de Conférences (Mathématiques M.P.C.).
Mme	GRANLET	Maître de Conférences (Mathématiques M.P.C.).
M.	CAUCAL	*Conseiller Administratif, Chef des Services Administratifs de la Faculté des Sciences.*

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

contribution à l'étude de l'activité des enzymes du sol : L'ASPARAGINASE

© by ORSTOM, Paris 1965.

contribution à l'étude de l'activité des enzymes du sol : L'ASPARAGINASE

par M. MOURARET
maître de recherches ORSTOM
Centre ORSTOM de Tananarive
et
Services Scientifiques Centraux
BONDY

ORSTOM
PARIS
1965

AVANT-PROPOS

Cette étude a été réalisée à l'Institut de Recherche Scientifique de Madagascar où nous avons trouvé d'excellentes conditions de travail. Nous tenons à exprimer notre vive reconnaissance à ses Directeurs, M. PAULIAN et M. le Professeur MILLOT ainsi qu'à la Direction de l'O.R.S.T.O.M.

Nous remercions M. le Professeur JACQUET d'avoir bien voulu présider notre jury et M. le Professeur BINET qui a accepté d'en faire partie. Leurs conseils éclairés nous ont été très utiles.

Nous exprimons notre gratitude à M. le Professeur KAUFFMANN qui nous a guidé efficacement. En nous accueillant dans son laboratoire, il nous a permis d'achever ce travail dont il a bien voulu être le rapporteur.

Notre reconnaissance va à M. AUBERT, Professeur à l'O.R.S.T.O.M. qui nous a initié à la Pédologie et orienté vers la Biologie des sols ainsi qu'à nos camarades de l'I.R.S.M., en particulier C. MOUREAUX, qui nous ont fait profiter de leurs connaissances.

Nous remercions également les Techniciens qui ont participé très activement à la réalisation de ce travail :

Mme L. SUAVIN, MM J. ANDRIAJAFITRIMO, F. RATSIMIHAH et B. RAZAFINDRAKOTO.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 11

Première partie

MESURE DE L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE DANS LES SOLS

I. — ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE EN PRÉSENCE DE BORATE 19

Sols employés 19

Technique de mesure 20

1. matériel 20
2. solutions 20
3. mesure de la production d'ammonium; description de l'appareil à distiller; fonctionnement; dosage de l'ammonium dans les suspensions de terre 22
4. témoins de la mesure 28

Origine de l'ammonium libéré au cours de la mesure 34

Influence de divers facteurs sur la mesure de l'activité de l'asparaginase 36

1. température, pH, nature des cations 36
2. durée de la réaction 37
3. concentration en substrat et poids de terre 39

Étude statistique des résultats 41

II. — ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE EN L'ABSENCE DE BORATE. MISE EN ÉVIDENCE D'UNE DEUXIÈME ASPARAGINASE 41

Influence de la composition des solutions-tampon sur les témoins de la mesure 41

Influence du borate sur l'activité de l'asparaginase des sols 44

III. — ÉTUDE DE FACTEURS SUSCEPTIBLES DE PROVOQUER UNE AUGMENTATION D'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE DANS LES SOLS 50

Augmentation de l'activité enzymatique en présence de nitrate 51

Influence du pH et de divers éléments minéraux sur l'augmentation d'activité enzymatique due au nitrate 54

Deuxième partie

LOCALISATION DE L'ASPARAGINASE DANS LES SOLS

IV. — ÉLUTION DE L'ASPARAGINASE DANS LES SOLS 57

Préparation des solutions d'asparaginase de levure 57

Recherche des conditions d'élution dans les sols. Comportement respectif de l'asparaginase de levure et de l'asparaginase du sol 61

1. élution par mise en suspension du sol dans la solution éluante 62
2. élution de l'asparaginase par filtration de la solution éluante à travers le sol... 63

V. — ÉTUDE COMPARÉE DE DIVERS FACTEURS SUR L'ASPARAGINASE DES SOLS ET L'ASPARAGINASE DES CELLULES DE LEVURE 68

Asparaginase des sols 68

1. influence de traitements du sol par la chaleur sur l'activité de l'asparaginase... 68
2. influence de traitements préalables du sol par le nitrate sur l'activité de l'asparaginase 76

Asparaginase des cellules de levure 81

Troisième partie

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE DANS LES SOLS HUMIDIFIÉS MAINTENUS A 30° ET ENRICHIS OU NON EN CELLULOSE

VI. — INFLUENCE DE LA DURÉE DE L'INCUBATION ET DE LA QUANTITÉ DE CELLULOSE AJOUTÉE AU SOL, SUR L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE..... 87

Méthode : incubation des sols, mesure de la production de gaz carbonique 87

Résultats 89

VII. — RECHERCHE DES FACTEURS IMPLIQUÉS DANS LA RÉPONSE DE L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE A L'ADDITION DE CELLULOSE 93

Activité enzymatique des microorganismes appartenant à différents groupes physiologiques 93

1. cellulolytiques 94
2. fixateurs de l'azote atmosphérique 95
3. humivores 96

Substances du sol solubles dans l'eau 96

Interprétation 99

VIII. — ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE ET DE SA RÉPONSE A L'ADDITION DE CELLULOSE, EN RELATION AVEC LA FERTILITÉ DES SOLS 100

Sols employés 100

Mesure de l'activité de l'asparaginase 101

Résultats de quelques tests microbiologiques (azote minéralisable, nitrification en milieu liquide et numération des fixateurs d'azote, tableau 40) 102

Discussion 104

CONCLUSION 107

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 108

INTRODUCTION

Le sol est un milieu biologique complexe se prêtant mal à la mise en œuvre de techniques d'évaluation des activités microbiennes qui s'y déroulent. WINOGRADSKY (110) a reconnu la nécessité de recourir à une méthode écologique autorisant le libre jeu des compétitions pour une substance alimentaire, dans des conditions physiques voisines de celles du sol. Les numérations électives sur gel de silice, qu'il a proposées, permettent de mettre en évidence de façon simple les microorganismes de différents groupes physiologiques. Elles traduisent une densité de « colonies actives » (77) dans le sol. De multiples objections ont cependant été formulées à l'encontre des numérations. Le développement des microorganismes est influencé par l'état de dessication du sol et sa conservation au laboratoire (98) (41). L'absence, dans les milieux artificiels, de facteurs nécessaires à la croissance entraîne une sous estimation de la densité des germes (58). D'après N. A. KRASIL'NIKOV (71), les méthodes basées sur l'ensemencement des échantillons de sol sur milieu de culture artificiel, ne reflètent guère les activités des organismes microbiens dans leur milieu naturel. Ces méthodes ne permettent d'isoler qu'un nombre limité de microorganismes, un grand nombre d'espèces, peut-être la majorité, ne pouvant être mises en évidence dans les conditions artificielles. Ceci pourrait être attribué d'après J. KAUFFMANN (communication non publiée) à l'effet sélectif des milieux artificiels : sur les milieux riches les espèces à prolifération rapide devancent les microorganismes à croissance lente qu'elles gênent soit par suite d'une compétition alimentaire, soit par production de substances antibiotiques. Les milieux pauvres tels que l'extrait de terre permettent le développement d'un plus grand nombre d'espèces dont la croissance limitée se traduit par des colonies punctiformes.

Une deuxième méthode d'estimation de l'activité biologique du sol consiste à mesurer la vitesse de dégradation de diverses substances dans le sol. Ainsi après addition d'une matière azotée (urée, peptone, farine de soja), on détermine la quantité d'ammonium qui apparaît (91) ; ou bien après avoir ajouté du glucose on évalue la proportion de cette substance qui est utilisée (85). La nécessité d'obtenir un phénomène mesurable peut conduire à effectuer des additions de substances telles qu'elles modifient profondément les équilibres biologiques. Ceci n'est cependant pas, *a priori*, un inconvénient dans le cadre d'études de critères permettant de différencier les sols. L'utilisation de l'appareil de Warburg pour la mesure de la respiration des sols, permet l'addition de faibles quantités de substances organiques lesquelles ne perturberaient pas les équilibres biologiques. Il a pu être distingué par ces mesures, lors de la dégradation du glucose, différentes phases qui sont sous la dépendance du traitement préalable du sol (28), (29). On doit également citer ici les mesures de la production de gaz carbonique ou de nitrate par une terre humidifiée, non enrichie en substances décomposables (85), (31) ; les valeurs obtenues sont globales, elles résultent de l'ensemble des processus qui aboutissent en définitive à la minéralisation de la matière organique des sols. Immédiatement après humectation du sol, on observe une intense respiration qui s'infléchit ensuite progressivement (101), (65). Ce flux de minéralisation est sous la dépendance des conditions qui ont précédé l'humectation (6), (7), (8), en particulier de la durée de la période au cours de laquelle le sol est demeuré sec, ainsi que de la température à laquelle il a été soumis donc du stockage et de la saison où a été effectué le prélèvement.

Une troisième méthode de mesure de l'activité biologique des sols réside dans l'évaluation de leur activité enzymatique. Elle s'est surtout développée depuis une dizaine d'années sous l'impulsion de E. HOFMANN et de ses collaborateurs. De nombreuses techniques de mesure ont été proposées :

(48), (51), (52), (53), (54), (55), (56), (59), (27), (45), (74), (99), (36), (64). Les enzymes étant susceptibles de réagir dans des conditions éloignées des conditions vitales, il est possible d'obtenir des vitesses de réaction élevées. Ceci permet de réaliser des techniques de mesure très sensibles qui ne nécessitent pas une amplification préalable du phénomène étudié, par multiplication des microorganismes, contrairement à ce qui a lieu pour les méthodes précédentes.

La signification des mesures enzymatiques est cependant controversée. Ainsi d'après J. P. CONRAD (18) l'uréase adsorbée sur les colloïdes serait en quantité nettement plus importante que l'uréase contenue dans les microorganismes et interviendrait pour une part prépondérante dans l'hydrolyse de l'urée ajoutée au sol. E. HOFMANN (49) indique d'une manière plus générale que les ferments provenant des microorganismes morts se fixent dans le sol et y participent aux transformations de matières. Les mesures enzymatiques incluant l'action de ces ferments et de ceux des microorganismes, seraient, d'après l'auteur, le seul moyen d'évaluer l'intensité des réactions ayant lieu dans le sol. H. KOEPF (66) admet également que le sol renferme des ferments adsorbés mais ne leur attribue, par contre, aucun rôle dans les transformations de matières. D'après A. D. Mc LAREN (81), (82), la présence d'enzymes adsorbées dans le sol est peu probable car ces substances protéiques peuvent être attaquées par les microorganismes. L'activité de l'uréase dans les sols stériles résulterait de la diffusion de l'urée et de l'ammonium à travers les parois des cellules mortes.

La rétention des enzymes par le sol a été invoquée dès les premières études enzymatiques du sol pour rendre compte du fait que certaines réactions n'étaient pas arrêtées par la présence d'antiseptique. Cependant cette interprétation exclut l'action des enzymes cellulaires dont l'activité peut se poursuivre après addition d'antiseptique. V. SUBRAHMANYAN (104) a observé que la production d'ammoniac dans le sol n'était pas supprimée mais simplement diminuée par addition de toluène. Plus récemment J. P. CONRAD (17), (18), (19) a montré que l'hydrolyse de l'urée dans les sols n'était pas sensiblement affectée par le toluène, tandis que le chauffage du sol à 85° et la présence d'inhibiteurs de l'uréase tels que le chlorure mercurique et la trypsine ont un effet dépressif très marqué. Dans deux études ultérieures (21), (22) J. P. CONRAD signale une accélération de la vitesse d'hydrolyse de l'urée dans certains sols, lorsque ceux-ci sont percolés par des fractions successives d'une solution d'urée, en présence de toluène. L'auteur montre que ce phénomène n'est pas imputable à un développement de microorganismes et propose deux hypothèses pour en rendre compte. Dans la première, conforme à la notion précédente, l'uréase adsorbée, dont les groupements réactifs seraient en majorité bloqués, deviendrait active par libération de ces derniers. Dans la deuxième hypothèse, l'activité enzymatique serait latente dans les cellules vivantes et mortes; l'accélération observée proviendrait donc d'une augmentation de la vitesse de libération d'uréase, principalement par les cellules mortes.

Plusieurs tentatives d'élution des enzymes du sol ont été faites dans le but de montrer que celles-ci peuvent s'y trouver à l'état adsorbé. Dans une étude publiée en 1910, C. FERMI (35) signale l'élution d'une enzyme protéolytique par l'eau phéniquée. Cependant, cette étude ne comporte pas de résultats quantitatifs; en outre, il y est mentionné que l'élution effectuée sur des sols enrichis en enzymes était très limitée. Ainsi la trypsine ne pouvait être décelée dans les extraits que si elle avait été ajoutée au sol à la dose de 5 à 10 % tandis que la pepsine et la papaïne ajoutées à la dose de 5 % n'étaient pas décelables. L'extraction d'une désaminase du sol a été mentionnée par V. SUBRAHMANYAN (104). C. ANTONIANI et ses collaborateurs signalent d'autre part (3) l'élution d'une enzyme catepsinique. L'activité enzymatique de ces extraits est cependant très faible. Récemment M. H. BRIGGS et L. SEGAL (9) sont parvenus à isoler du sol des protéines possédant une activité uréasique. Ces protéines étaient extraites par un tampon-phosphate de pH 6,0, puis floculées par l'acétone. Les auteurs n'indiquent pas quelle fraction de l'activité enzymatique du sol représente l'activité de l'uréase éluée, mais ils considèrent que la plus grande partie des enzymes du sol est contenue dans les cellules vivantes. M. MARTIN-SMITH (76) a obtenu des extraits de sol présentant une activité uricasique. Deux

enzymes étaient éluées par le phosphate, l'une à pH 7,0, l'autre à pH 8,4; elles se différenciaient par leur comportement en présence d'inhibiteur. Cependant ces résultats concernent un sol proche d'un poulailler et un sol de pâturage permanent. Ces sols reçoivent donc des apports importants de substrat; leur richesse en uricase est par suite exceptionnellement élevée. Dans ces conditions, l'obtention d'extraits actifs n'est pas un indice de la présence générale de quantités appréciables d'uricase libre dans les sols.

J. P. Conrad (18) signale qu'il n'a pu obtenir l'élution de l'uréase naturellement présente dans le sol ni celle de l'uréase de soja qui y avait été fixée. A défaut d'élution, l'aptitude du sol à adsorber l'uréase de soja est considérée par l'auteur comme un indice de la présence d'uréase adsorbée dans le sol. L. A. Pinck et F. E. Allison (90) ont par contre obtenu l'élution d'une fraction de l'uréase commerciale adsorbée sur de la montmorillonite. E. Hofmann et A. Seegerer (47) ont montré que la saccharase de levure se fixe dans le sol; les auteurs en déduisent que les enzymes du sol sont elles-mêmes adsorbées. Nous avons de notre côté (84) adsorbé l'asparaginase de levure dans sept sols de Madagascar; mais nous avons également obtenu l'élution ultérieure d'une proportion importante de cette enzyme de levure. Par contre, la technique employée ne permettait pas l'extraction, même en faible quantité, de l'asparaginase naturellement présente dans les sols, ce qui semble bien indiquer que celle-ci ne s'y trouve pas à l'état adsorbé. Cette conclusion ne peut être étendue à l'ensemble des enzymes; mais elle montre l'insuffisance du test de l'adsorption comme indice de la présence d'enzymes adsorbées dans le sol. D'après G. Hoffmann (46) le mode de fixation des enzymes adsorbées expérimentalement pourrait être différent de celui des enzymes naturellement présentes dans les sols ce qui expliquerait la difficulté d'éluer ces dernières.

L'étude de la stabilité des enzymes adsorbées expérimentalement dans le sol ne permet pas non plus de confirmer l'hypothèse de l'accumulation d'enzymes adsorbées dans le sol. Ainsi l'asparaginase de levure fixée par le sol est inactivée lors du séchage ultérieur de celui-ci. L'uréase de soja et la saccharase de levure ont, par contre, résisté à la dessication; cependant, la première de ces enzymes est progressivement inactivée dans le sol maintenu humide. B. J. Stojanovic (103) a également observé une diminution d'activité de l'uréase commerciale ajoutée au sol; cette diminution est de 50 % au cours des douze premières heures, puis l'activité continue à décroître moins rapidement pendant les soixante-douze heures qui suivent. Quant à la saccharase de levure I. Kiss et I. Balint (63) ont montré qu'elle ne conservait pas longtemps son activité dans le sol humide. A. Sh. Galstyan (39) a établi que les enzymes naturellement présentes dans le sol sont plus stables que les enzymes correspondantes provenant d'un apport extérieur. L'invertase et l'amylase ont été ajoutées à trois sols de pH respectif 5,5, 7,6 et 8,2; ces enzymes, actives en milieu acide, sont d'autant plus rapidement inactivées que le pH du sol est plus élevé. C'est l'inverse qui a lieu pour la peroxydase, enzyme active en milieu basique. Dans les meilleures conditions de stabilité, 30 % de l'invertase, 40 % de la peroxydase et 83 % de l'amylase sont inactivées après 30 jours.

Deux processus ont pu intervenir pour provoquer cette disparition d'activité. Le premier réside dans la rigidité avec laquelle les protéines sont retenues, comme cela est rapporté dans une étude générale de C. A. Zittle (112) sur l'adsorption. L'auteur mentionne que l'inactivation consécutive à l'adsorption a été observée pour de nombreuses enzymes. Le deuxième, dont l'effet est moins rapide, est la destruction des enzymes fixées par le sol, destruction qui interdit leur accumulation hors des cellules. Il a été montré que les substances protéiques adsorbées peuvent être dégradées par les enzymes. A. D. Mc Laren (80) a établi que la lysozyme inactivée par la chaleur et adsorbée sur la kaolinite était digérée par la chymotrypsine. E. F. Esterman et A. D. Mc Laren (33) ont montré que l'adsorption de la lysozyme dénaturée pouvait augmenter la vitesse avec laquelle cette protéine est attaquée par certains microorganismes. Ceci serait dû à l'effet de concentration résultant de l'adsorption du substrat et d'exoenzymes produites par les microorganismes.

Une étude de G. HOFFMANN (44) relative à la localisation des enzymes sur les différentes fractions granulométriques du sol apporte également des résultats qui sont en opposition avec l'hypothèse d'une accumulation des enzymes hors des cellules des microorganismes. L'auteur a montré en effet que la proportion la plus importante d'enzymes se trouvait dans la fraction limoneuse qui est la plus riche en microorganismes et non dans la fraction argileuse dont le pouvoir adsorbant est le plus élevé. On doit cependant relever une exception en ce qui concerne l'uréase.

D'après I. KISS et I. BALINT (63) l'accumulation d'enzymes dans le sol pourrait résulter essentiellement de la stabilité des enzymes dans les cellules mortes et les fragments cellulaires. Ces auteurs ont montré que des cellules de levure vivantes ou partiellement autolysées, introduites dans le sol, présentaient encore respectivement 11,3 % et 6,6 % de l'activité saccharasique initiale, après trois semaines d'incubation. Ces proportions étaient un peu plus élevées lorsque de la kaolinite ou de la bentonite était ajoutée au sol. Par contre, l'augmentation de l'activité saccharasique du sol, consécutive à l'addition d'autolysats sans cellule, avait complètement disparu après cette période d'incubation. Ceci suggère que la saccharase contenue dans les cellules mortes et les fragments de cellules, doit représenter une plus grande fraction de la saccharase du sol que l'enzyme libérée par les cellules et adsorbée sur les colloïdes. Cependant, bien que la vitesse d'inactivation soit plus faible dans les cellules mortes, ce qui permet le maintien transitoire de la saccharase dans le sol, il n'est pas démontré que la fraction non détruite soit stable et par suite que l'effet protecteur observé donne lieu à une accumulation d'enzymes dans le sol. On doit mentionner ici les expériences de H. KOEPF (66) établissant que la saccharase de la racine ne contribuait pas à accroître la teneur du sol en cette enzyme; en effet, l'activité de la saccharase de la racine diminue progressivement après la mort de la plante puis disparaît.

L'hypothèse d'une accumulation d'enzymes dans le sol repose principalement sur le fait que l'activité biologique des sols et leur teneur en enzymes ne présentent pas toujours de corrélation. Ainsi H. KOEPF a montré qu'après stérilisation partielle du sol par la chaleur, la saccharase (65) et l'uréase (66), qui étaient presque entièrement détruites par ce traitement, n'étaient pratiquement pas reformées lors de l'incubation ultérieure du sol, bien que la stérilisation soit suivie d'une augmentation de la production de gaz carbonique correspondant à une reprise de l'activité microbienne. L'auteur signale également, dans ces deux études, que les fluctuations d'intensité de l'activité microbienne au cours de l'année, ne peuvent être suivies au moyen de l'évaluation de la teneur des sols en saccharase et uréase. Celle-ci présente en effet une constance assez marquée, tout au moins en sol non recouvert par la végétation. Sous végétation, quelques fluctuations ont lieu: pour la saccharase elles sont imputables à la formation puis à la destruction de saccharase des racines; quant à l'uréase, une production de cette enzyme semble se rattacher à une activité microbienne liée à la décomposition des racines, mais cette production est assez limitée. D'après l'auteur, l'activité microbienne ne mettrait en jeu qu'une quantité minime de ces deux enzymes; les microorganismes ne renfermeraient donc qu'une très faible proportion de la masse totale de saccharase et d'uréase présentes dans le sol.

D'après J. DROBNIK (26), la production d'enzymes dans le sol serait en relation avec leur spécificité et non avec l'activité biologique globale. L'auteur rapporte à l'appui de cette hypothèse, le fait que l'augmentation d'activité biologique due à l'addition de glucose au sol, s'accompagne d'une diminution de l'activité de la saccharase. D'après I. B. ALEXANDROV (1), également, l'activité des ferments dans le sol reflète seulement des processus de transformation de certains groupes de substances bien déterminés. A. Sh. GALSTYAN (37) (40) émet la même opinion. Cet auteur estime que, pour évaluer l'activité biologique globale de différents sols, il est indispensable d'étudier l'activité de différents groupes d'enzymes et l'intensité respiratoire; cependant pour un seul type de sol, la détermination d'un seul groupe d'enzymes et la respiration devraient suffire. L'activité des enzymes du groupe carbohydrase (invertase, amylase, β-glucosidase) pourrait être représentée par une mesure effectuée sur une seule de ces enzymes, une corrélation se présentant entre elles (38). D'après

J. KEILLING (62), la phosphatase étant impliquée dans toutes les assimilations, fermentations et nutritions, la mesure de son activité devrait permettre de saisir tous les phénomènes.

Cependant cette notion d'une production adaptative d'enzymes dans les sols, ne rend pas compte du fait que l'activité enzymatique ne présente pas, généralement, de fluctuation très importante au cours de l'année. Fait qui se retrouve dans une étude de YE. RUNOV et O. S. TEREKHOV (96) sur la catalase de sols de différents types et sous divers couverts végétaux. R. S. KATSNEL'SON et V. V. ERSHOV (60) rapportent que les teneurs de divers sols en catalase, protéase et saccharase subissent peu de changements au cours de l'année; toutefois dans quelques cas des fluctuations de la teneur en saccharase ont lieu. A. Sh. GALSTYAN signale des fluctuations assez faibles mais parallèles d'activités enzymatiques (invertase, β-glucosidase et amylase) (38), (catalase, peroxydase et invertase) (37). Des variations assez importantes de l'activité enzymatique des sols, sont rapportées dans les études de S. M. MASTAKOV, T. N. KULAKOVSKAYA et S. M. GOL'DINA (79), V. S. SHUMAKOV (97), A. A. NIZOVA (89) et C. MOUREAUX (86), mais elles peuvent résulter au moins partiellement d'une production d'enzymes par les végétaux. C. MOUREAUX signale en particulier le rôle possible des Lichens en sol nu. Dans une étude effectuée sur des sols de l'Est de la Sibérie par K. A. KOSLOV (69), des différences très importantes de l'activité saccharasique sont mentionnées entre les mois de juin et juillet. Elles ont lieu sur 50 cm de profondeur dans un sol sous forêt de Pin et Bouleau et dans un sol sous steppe. Elles affectent seulement les 20 premiers centimètres dans un sol cultivé. Ces changements ne paraissent pas liés à l'activité microbienne. En effet la densité des microorganismes est plus élevée en juillet où les pluies ont été abondantes qu'en juin où s'est prolongée la sécheresse de printemps; par contre l'activité enzymatique est la plus élevée en juin. Il est possible que ces résultats traduisent une destruction de la saccharase des racines dans le sol imbibé d'eau.

Des relations positives se présentent cependant entre l'activité biologique des sols et leur activité enzymatique. Ainsi, il a été reconnu que l'activité enzymatique diminue généralement de la surface vers la profondeur; elle se trouve parfois presque entièrement localisée dans la litière. La répartition des enzymes à travers le profil est donc parallèle à celle des microorganismes. D'autre part, K. A. KOSLOV (69) signale une augmentation de l'activité catalasique des sols après la mise en culture, laquelle amène des conditions favorables à l'activité microbienne. Des corrélations entre la production d'enzymes dans le sol et l'activité biologique ont été observées dans certaines conditions. R. H. JACKMAN et C. A. BLACK (59) rapportent que l'activité phytasique et la production de gaz carbonique sont sensiblement proportionnelles, lors de la dégradation de la farine de Luzerne dans un sol stérilisé puis ensemencé avec un extrait de sol frais. J. P. CONRAD (20) a montré que dans un sol préchauffé, ne contenant plus d'uréase, l'addition de substances décomposables peut provoquer une formation plus ou moins importante d'uréase. L'effet est maximum après soixante-quatre jours d'incubation avec la farine de Luzerne et un mélange de paille et gélatine. D. A. HAIG (43) rapporte qu'une production d'estérase a lieu dans les sols autoclavés enrichis en farine de Luzerne elle-même autoclavée. I. L. STEVENSON (102) signale que dans un sol peu actif auquel a été ajouté du matériel végétal, l'activité déshygrogénasique évolue parallèlement au nombre de microorganismes et à l'activité biologique mesurée par la consommation d'oxygène. Pour divers sols simplement humidifiés, les teneurs en déshydrogénase présentent une corrélation avec les consommations d'oxygène mais non avec les densités des microorganismes. La réduction de l'indicateur employé pour la mesure dépend seulement de l'activité normale des cellules dans les conditions anaérobies du test.

On doit noter que les mesures réalisées par I. L. STEVENSON, sont effectuées en l'absence d'antiseptique. Dans les techniques d'évaluation des activités enzymatiques des sols, le toluène est habituellement utilisé pour empêcher une synthèse d'enzymes par les cellules du sol au cours de la mesure, ainsi que l'assimilation des produits de la réaction; mais également dans le but de libérer les enzymes endocellulaires. Son efficacité est cependant mise en doute par D. CLAUSS et K. L. MECHSNER (14), qui ont observé un plus grand nombre de microorganismes dans les sols, après avoir soumis ces

derniers aux mesures enzymatiques proposées par E. HOFMANN, en présence comme en l'absence de toluène. D'après D. A. HAIG (43), l'hydrolyse de l'urée dans les sols en présence de toluène résulterait d'une production d'uréase par les microorganismes au cours de la mesure, soit par multiplication cellulaire, soit par induction dans les cellules non proliférantes. L'auteur rapporte que l'hydrolyse de l'urée dans un sol n'a plus lieu après traitement de celui-ci par l'oxyde d'éthylène, bien que ce corps n'ait aucun effet dépressif sur l'uréase ajoutée au sol; ceci indiquerait que le sol ne renfermait pas d'uréase avant l'addition de l'urée. Cette conclusion n'est cependant pas confirmée par le comportement du sol après stérilisation par un faisceau d'électrons (81); en effet, l'activité uréasique persiste bien que les microorganismes soient tués. J. DROBNIK (30) a montré que le toluène empêche l'utilisation du glucose par les microorganismes dans le sol; il empêche également la production de gaz carbonique dans le sol enrichi en saccharose. Cependant, d'après l'auteur, on ne peut être sûr que le toluène soit toujours efficace lors des mesures enzymatiques effectuées sur le sol. H. T. ROGERS (93) rapporte que le toluène empêche la production de gaz carbonique dans le sol enrichi en saccharose seul ou avec glycérophosphate, et considère ce corps comme un antiseptique efficace. J. P. CONRAD (21) a montré que l'augmentation de l'activité uréasique se produisant au cours de la percolation du sol par une solution d'urée, en présence de toluène, n'est pas due à une multiplication des microorganismes. G. DURAND (32) rapporte qu'une activité allantoïnasique se manifeste dans un sol après induction préalable de l'enzyme par le substrat à 30°. L'activité enzymatique a lieu en présence de toluène, mais ce dernier empêche l'induction de l'enzyme.

L'activité enzymatique des sols a également été considérée en fonction de facteurs tels que la végétation, la teneur du sol en carbone, azote, argile, les fumures, le type de sol et la fertilité. La végétation a une nette influence sur l'activité enzymatique des sols. E. HOFMANN, E. WOLF et W. SCHMIDT (50) rapportent qu'après élimination d'une pelouse, les activités saccharasique et uréasique, dans les dix premiers centimètres diminuent progressivement pour atteindre après une année des valeurs nettement inférieures à celles du témoin sous prairie. Au-dessous de dix centimètres les activités enzymatiques ne sont pratiquement pas affectées. Y. E. RUNOV et O. S. TEREKHOV (96) ont trouvé que l'activité catalasique est plus élevée sous forêt que sous jachère; sous forêt est observée une influence particulière de la nature du peuplement. P. L. VERONA (107) (108) a montré que la germination des graines provoque une augmentation des activités catalisique et saccharasique du sol à proximité des graines. L'augmentation est fonction de l'espèce végétale et dans une plus grande mesure du type de sol. G. S. DAVTYAN (23) signale que les activités saccharasique et uréasique sont un peu plus élevées dans la rhizosphère que hors de celle-ci. L'influence de la végétation réside vraisemblablement dans la stimulation de l'activité microbienne par l'apport de matière organique. Une action directe des ferments des plantes doit également être considérée. H. T. ROGERS (94) a montré que les racines libèrent des cellules superficielles hydrolysant certains composés phosphorés organiques. E. F. ESTERMANN et A. D. Mc LAREN (34) ont mis en évidence une activité phosphatasique dans la coiffe et à la surface des racines. N. A. KRASIL'NIKOV (70) signale que les racines entières de Blé, Maïs et Pois hydrolysent le saccharose et l'amidon mais non la gélatine.

H. KOEPF (67) a montré que des corrélations se présentent entre, d'une part, les activités saccharasique, uréasique et glucosidasique de six sols de culture et, d'autre part, la proportion d'éléments fins (inférieurs à 0,01 mm) et la teneur en carbone ou azote. L'activité enzymatique serait également en corrélation avec le rapport C/N. Les équations de corrélation présentent cependant des facteurs de correction plus ou moins importants. A. Sh. GALSTYAN (38) rapporte que des activités enzymatiques (invertase, β-glucosidase et amylase) sont en corrélation avec la teneur des sols en humus. H. KOEPF (67) signale que dans quatre types de sol, les activités saccharasique et uréasique ne sont pas uniformisées par l'application de techniques culturales identiques poursuivies pendant quinze années. Des fumures très différentes (paille, fumure minérale, fumier d'étable) n'entraînent que des différences peu marquées des activités saccharasique et uréasique (68). Ceci indiquerait que l'activité

enzymatique est essentiellement conditionnée par des facteurs propres à chaque sol, non susceptibles de modification importante (teneur en carbone et éléments fins). Des résultats analogues ont été obtenus par E. Hofmann, E. Wolf et W. Schmidt (50) pour trois types de sols dans lesquels les activités saccharasique et uréasique sont peu influencées par l'application de fumier d'étable, de fumure minérale ou de combinaisons des deux, pratiqués pendant deux années. D'autres mesures d'activité enzymatique rapportées par E. Hofmann (49) (57) traduisent cependant une influence plus marquée de la fumure lorsque celle-ci est à la fois azotée et phosphorée. A. Sh. Galstyan (37) rapporte que les engrais et les labours provoquent une modification de l'activité enzymatique des sols; cette modification est cependant assez limitée contrairement à ce qui a lieu pour la respiration. L'auteur signale (40) qu'il a obtenu une corrélation entre la récolte de blé d'hiver et l'activité de l'invertase dans 9 parcelles. H. Koepf (68) mentionne qu'aucune relation ne se présente entre la richesse des sols en phosphore et potassium et leur activité enzymatique. D'après A. Baroccio (5), l'activité catalasique des sols est en relation avec la richesse en matière organique et dans une faible mesure avec la teneur en phosphore soluble mais non avec celle du potassium. L'activité catalasique serait « un indice biopédologique de fertilité » de signification orientative et utile dans de nombreux cas pratiques où l'on ne peut recourir à l'analyse chimico-physique ou aux vérifications agronomiques.

Il ressort de ces études que l'activité enzymatique des sols présente généralement une inertie assez marquée et ne semble pas être en relation très étroite avec l'activité biologique et la fertilité. Ceci a été interprété comme un indice de la présence dans le sol d'enzymes accumulées provenant des microorganismes morts. Toutefois l'accumulation d'enzymes n'a pu être démontrée; leur faible stabilité la rend même peu probable. L'explication du comportement des enzymes du sol pourrait donc être ailleurs, peut être dans une certaine stabilité du paysage microbien. En premier lieu contribueraient à cette stabilité les microorganismes que S. Winogradsky (110/p. 418) désigne par « ... le groupe autochtone ou humivore, à activité continue, qui se porte sur l'oxydation de la matière organique du sol... ». Quant aux microorganismes du « ... groupe zymogène, qui attaque divers éléments organiques et dont l'activité est liée à leur apport ... », leur action minéralisatrice peut être rapide lorsqu'elle affecte les substances organiques facilement décomposables, mais celles-ci ne représentent qu'une fraction de la masse totale des matières organiques faisant retour au sol. D'après J. Pochon et H. De Barjac (92, p. 67), « Toutes ces réactions de synthèse (fixation de l'azote atmosphérique) et de minéralisation (des éléments constitutifs des végétaux et des animaux morts) ne sont pas effectuées de façon brutale, mais par de longues chaînes de réactions étroitement intriquées et couplées ». On doit également considérer que les ferments des cellules au repos assurent la permanence d'une fraction des enzymes du sol.

L'étude de l'activité enzymatique des sols rapportée ici concerne l'asparaginase. Elle a pour but de préciser la situation d'une enzyme dans le sol, problème dont l'importance est mise en évidence par la diversité des interprétations de mesures d'activité enzymatique dans les sols. L'asparaginase a été choisie car cette enzyme très largement répartie (111) a été peu étudiée dans les sols; de plus son activité peut être facilement évaluée par le dosage de l'ammonium libéré. Les conditions optimales de la mesure ont été déterminées dans différents échantillons de terre. Ensuite des critères de la localisation de l'asparaginase dans les sols ont été recherchés en étudiant comparativement le comportement de cette enzyme et celui de l'asparaginase de levure. D'une part, l'asparaginase naturellement présente dans les sols et l'asparaginase de levure adsorbée expérimentalement dans ces sols à partir d'une préparation purifiée de cette enzyme ont été comparées quant à leur aptitude a être éluées. D'autre part, nous avons examiné l'influence de divers facteurs sur l'activité de l'asparaginase des sols et sur l'activité de l'enzyme contenue dans les cellules de levure. Enfin des relations entre l'asparaginase et l'activité de la microflore ont été recherchées au moyen d'incubations de sols enrichis en cellulose. Un essai d'application de la mesure de l'activité de l'asparaginase à l'évaluation du niveau de fertilité des sols a également été réalisé.

première partie

MESURE DE L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE DANS LES SOLS

I. — ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE EN PRÉSENCE DE BORATE

Sols employés.

Les échantillons de terre ont été choisis en petit nombre mais très différents les uns des autres, de manière à dégager, d'une part, les caractéristiques générales de l'activité de l'asparaginase du sol et, d'autre part, l'influence des conditions particulières de chaque sol. Ces échantillons ont été prélevés dans trois régions climatiques différentes: les Hauts-Plateaux malgaches, le versant oriental de ces plateaux et la zone côtière orientale de Madagascar. Ils proviennent de sols formés sur roches métamorphiques, sauf les échantillons FP et FV qui appartiennent à des sols formés sur roche volcanique. Les prélèvements ont été effectués sous divers couverts végétaux. Une brève description de ces sols est présentée ci-après:

PR : Hauts-Plateaux, environs de Tananarive, sol sur replat, au sommet d'une colline, sous prairie, pH: 5,4.
JA : Hauts-Plateaux, environs de Tananarive, sol de jardin sur terrasse, à mi-pente, pH: 5,6.
MA: Hauts-Plateaux, environs de Tananarive, sol de marais, très organique, pH: 4,6.
RI : Hauts-Plateaux, environs de Tananarive, sol de rizière, sur alluvions, pH: 5,3.
SA : Hauts-Plateaux, Tananarive, Parc Botanique, sol sur pente, sous Pin, pH: 5,6.
SB : Hauts-Plateaux, Tananarive, Parc Botanique, sol sur alluvion sous prairie, pH: 6,3.
FP : Hauts-Plateaux, environs d'Ambatolampy, sol sur pente, sous forêt de Pin, très organique, pH: 5,3.
FV : Hauts-Plateaux, environs d'Ambatolampy, sol sur pente, sous forêt climatique dégradée, très organique, pH: 4,8.
FM: Versant oriental des Hauts-Plateaux, région de la Mandraka, sol sur très forte pente, peu profond, sous forêt climatique dégradée, pH: 5,5.
FT : Zone côtière orientale, région de Tamatave, sol sur pente, sous forêt de Ravenale, pH: 5,3.

Le pH des échantillons a été mesuré au moyen d'un pH-mètre, à partir d'une suspension de terre dans laquelle le rapport terre/eau était de 1/5. Les désignations employées correspondent à un échantillon prélevé en un lieu et à un moment donnés. Une lettre grecque précède ces désignations pour chacun des autres prélèvements effectués au même lieu. Les échantillons ont été séchés à l'air, débarrassés des racines et des débris végétaux. Ils ont été broyés et tamisés simultanément dans un

broyeur mécanique. Après homogénéisation, les échantillons étaient répartis dans des sacs en matière plastique. La conservation au laboratoire, pendant dix-huit mois, d'un échantillon de sol séché n'a pas affecté son activité enzymatique.

Technique de mesure.

1. Matériel

La réaction enzymatique est effectuée dans des tubes à fond plat de 2 cm de diamètre et 10 cm de hauteur. Ces tubes reçoivent 5 cm^3 d'eau, 10 cm^3 d'une solution-tampon contenant 2,5 % d'asparagine Merck, puis 5 g de terre séchée à l'air et passée au tamis de 1 mm. Ils sont fermés par un bouchon de caoutchouc, agités énergiquement pendant quelques secondes puis placés en position verticale dans une boîte rectangulaire en cuivre. La boîte est immergée dans un bain-marie dont l'eau est maintenue à 49°; son couvercle, fixé par des boulons, appuie sur les bouchons, empêchant ainsi l'ouverture des tubes dans le bain-marie.

Certaines déterminations ayant nécessité l'emploi de 15 cm^3 de solution, ce volume a été adopté pour l'ensemble des mesures, afin d'opérer toujours dans les mêmes conditions de concentration en substrat. L'addition de 5 cm^3 d'eau précédemment mentionnée est effectuée dans ce but. Pour les sols très riches en asparaginase, 3 g de terre seulement ont été employés afin que la réaction ait toujours lieu dans la zone où la vitesse de réaction est proportionnelle à la quantité d'asparaginase. Les pesées de terre sont effectuées préalablement et conservées dans des tubes de verre. Les échantillons de terre peuvent ainsi être rapidement mis dans les solutions, ce qui limite la durée de la phase préparatoire et permet d'uniformiser les conditions expérimentales.

Le bain-marie provient des Établissements JOUAN. Sa cuve de forme cylindrique, en verre pyrex, contient environ 15 litres d'eau; elle est munie d'un agitateur à hélice. Le chauffage est assuré par trois lampes à infrarouge situées sous la cuve. Le réglage de la température est obtenu par un thermomètre VERTEX agissant sur les lampes au moyen de relais électriques. Un thermomètre à minima immergé dans le bain-marie signale les coupures de courant pouvant survenir éventuellement.

La boîte demeure pendant 21 heures dans le bain-marie, puis est refroidie par immersion dans l'eau courante pendant 15 minutes. Les tubes sont ensuite répartis dans des paniers et placés dans le compartiment à glace d'un réfrigérateur où ils demeurent jusqu'au moment de la distillation. Les opérations sont conduites de manière à sortir les tubes du bain-marie le matin et à procéder à la distillation dans le courant de la journée.

2. Solutions

Les solutions-tampon utilisées pour la mesure de la réaction enzymatique à différents pH, sont préparées en amenant à 2 litres, 108,9 g de phosphate monopotassique, 49,47 g d'acide borique et un volume connu de soude 4N; ceci donne une concentration de 0,4 M pour chacun des deux sels : le phosphate et le borate. Ces produits proviennent des Établissements Merck, ils répondent à la norme « pur ». Au tableau 1 sont rapportées les quantités de soude utilisées pour la préparation des différentes solutions de la gamme. Une cristallisation se produit dans les deux dernières solutions qui sont sursaturées; elle est faible dans le tampon PB6 et très importante dans le tampon PB7. Ces deux solutions sont réchauffées pour permettre la dissolution des cristaux puis refroidies immédiatement avant leur utilisation. Dans les milieux employés pour la mesure enzymatique ces solutions-tampon sont diluées ce qui évite une nouvelle cristallisation. Les pH de ces milieux sont mentionnés au tableau 1. Ils sont inférieurs à ceux des solutions-tampon correspondantes; l'abaissement de pH est dû à la présence d'asparagine.

Désignation des tampons	PB1	PB2	PB3	PB4	PB5	PB6	PB7
cm^3 de soude 4N contenue dans 2 litres de solution-tampon	35	160	220	290	360	520	630
pH des solutions composées de 10 cm^3 de solution-tampon, 5 cm^3 d'eau et 250 mg d'asparagine	6,0	7,2	8,1	8,9	9,5	11,0	11,9

Tableau 1. — Quantité de soude 4N employée pour la préparation des solutions-tampon et pH des milieux renfermant ces tampons et l'asparagine.

Le sol présente un pouvoir tampon plus ou moins élevé qui est essentiellement fonction de sa capacité d'échange; il modifie le pH du milieu auquel il est ajouté. Le décalage est d'autant plus important que le pH du sol est plus éloigné de celui du milieu et que sa capacité d'échange est plus élevée. Il est par contre d'autant plus limité que le pouvoir tampon du milieu est plus élevé. L'influence du sol sur le pH des milieux est rapporté au tableau 2. Dans la zone pH tamponnée par le phosphate et le borate (pH 6 à pH 9,5), où se situe l'optimum d'action de l'asparaginase, le décalage est assez faible et les pH des surnageants obtenus avec les différents sols sont voisins. Au delà de cette zone, le décalage devient plus important et les pH des surnageants ne sont plus aussi rapprochés. Le pouvoir tampon des solutions résulte ici de la présence du carbonate apporté par la soude employée pour la préparation des solutions (la soude en pastille renferme 1,5 % de carbonate) et de l'acide carbonique apporté par l'eau distillée.

Désignation des tampons		PB1	PB2	PB3	PB4	PB5	PB6	PB7
SOLS	FP	5,7	7,0	7,6	8,4	9,0	10,0	10,8
	FM	5,7	7,0	7,6	8,5	9,2	10,4	11,4
	FV	5,6	6,9	7,5	8,3	9,0	10,0	10,9
	MA	5,6	6,9	7,5	8,3	8,9	9,9	10,8
	PR	5,8	7,1	7,8	8,7	9,3	10,6	11,5
	FT	5,8	7,1	7,8	8,7	9,3	10,6	11,5
Différence entre les valeurs extrêmes		0,2	0,2	0,3	0,4	0,4	0,7	0,7

Tableau 2. — pH des surnageants, après un séjour de 21 heures à 49° des mélanges constitués par 3 g de sol FP, FM, FV ou 5 g de sol MA, PR ou FT, 5 cm^3 d'eau et 10 cm^3 de solution-tampon contenant 2,5 % d'asparagine.

Les pH des mélanges de terre et de solution ont toujours été mesurés après le séjour des tubes au bain-marie, à la fin de la réaction enzymatique. La terre est alors sédimentée au fond des tubes et le pH s'est fixé à sa valeur définitive. La mesure est effectuée en plongeant les électrodes coaxiales d'un pH-mètre dans le surnageant. Le pH du surnageant est très voisin de celui qui est mesuré après remise en suspension de la terre; la différence entre les valeurs obtenues dans les deux cas est de l'ordre de 0,1 à 0,2 unités pH. Le pH-mètre est étalonné à l'aide des solutions-tampons suivantes:

— la première, dont le pH est de 6,81 (9/p. 317) contient 13,617 g de PO^4H^2K et 35,822 g de PO^4HNa^2, 12 H^2O, par litre.

— la deuxième, dont le pH est de 8,51 (9/p. 324) contient 4,767 g de borax, 3,092 g d'acide borique et 0,731 g de ClNa, par litre.

— la troisième, dont le pH est de 9,9 (14/p. 146) contient 2,650 g de CO^3Na^2 anhydre et 2,100 g de CO^3HNa, par litre.

Deux autres gammes de solutions-tampon ont été préparées, afin de déterminer l'incidence éventuelle de la nature des cations sur la mesure de l'activité de l'asparaginase. Ces solutions renferment du phosphate et du borate à la concentration 0,4M ; dans les unes, ces sels sont uniquement sodiques et dans les autres, ils sont uniquement potassiques. Un litre de tampon sodique renferme 62,4 g de phosphate monosodique à 2 H^2O (Pur, Merck), 24,73 g d'acide borique et de la soude 4N. Un litre de tampon potassique renferme 54,45 g de phosphate monopotassique, 24,73 g d'acide borique et de la potasse 4N (Pure, Merck). Les quantités de soude ou de potasse 4N employées pour préparer ces solutions sont identiques aux quantités de soude utilisées pour la préparation des solutions portant le même numéro dans la précédente gamme de tampons. Les pH des milieux obtenus avec ces solutions sont légèrement différents de ceux des milieux préparés avec les premiers tampons (tableau 3). Une cristallisation se produit dans la solution PBNa6 qui est sursaturée.

Désignation des tampons	PBNa1	PBNa2	PBNa3	PBNa4	PBNa5	PBNa6
pH des solutions composées de 10 cm³ de solution-tampon, 5 cm³ d'eau et 250 mg d'asparagine	5,8	7,1	8,0	8,8	9,4	10,9
Désignation des tampons	PBK1	PBK2	PBK3	PBK4	PBK5	PBK6
pH des solutions composées de 10 cm³ de solution-tampon, 5 cm³ d'eau et 250 mg d'asparagine	6,0	7,3	8,2	9,0	9,7	11,3

Tableau 3. — pH des milieux renfermant l'asparagine et les tampons uniquement sodiques ou potassiques.

Dans les milieux, la concentration en acide borique est de 3,63 %. Cette concentration est vingt fois plus élevée que celle qui empêche le développement des bactéries et six fois plus élevée que la concentration qui réduit de plus de moitié le nombre de colonies de champignons, sur milieu solide synthétique ensemencé avec le sol, d'après les résultats rapportés par L. E. Tyner (105). Lorsque 15 cm³ de solution contenant 250 mg d'asparagine et 10 cm³ de solution-tampon ont été ensemencés avec 100 mg de terre puis maintenus pendant plusieurs jours à 40° ou 30°, aucun développement de microorganismes ne s'est produit.

3. Mesure de la production d'ammonium

L'activité de l'asparaginase est mesurée par la quantité d'ammonium libéré en 21 heures à 49°. L'ammonium est dosé après distillation effectuée sur la totalité du contenu des tubes, suivant une technique inspirée de celle de F. W. Parker (11/p. 375). L'entraînement de l'ammoniac s'effectue en milieu très nettement basique; dans ces conditions, l'asparagine qui n'a pas été hydrolysée par l'enzyme et se trouve en excès dans la solution, est peu stable. Il est donc nécessaire d'effectuer la distillation à température modérée, ce qui est habituellement réalisé au moyen de l'appareil de Yovanovitch (11/p. 438). Cet appareil présente l'inconvénient de ne permettre chaque fois qu'une seule distillation. Afin d'accroître le débit des mesures, nous avons construit sur le même principe un appareil dans lequel huit distillations sont effectuées simultanément.

a) *Description de l'appareil à distiller.*

Le schéma en est donné à la figure 1. Le générateur de vapeur est constitué par un ballon à fond plat d'une contenance de 6 litres (F1), renfermant 4 litres de solution de sulfate neutre de potassium à 1,25 °/₀₀. Deux électrodes de carbone (EL), d'un modèle utilisé dans les lampes à arc de projecteur cinématographique, plongent dans la solution. Chacune d'elle est maintenue par un fil de cuivre de 3 mm de diamètre et reliée au relais électrique. Le générateur est équipé d'un thermomètre Vertex (TH) à contacts électriques, relié au circuit de commande du relais. Ce thermomètre provoque l'établissement de la tension entre les deux bornes du circuit de chauffage dès que la température de la solution devient inférieure à 55°, puis son interruption lorsque cette température est atteinte. Ce type de chauffage ne présente pas d'inertie, la température de la solution dans le ballon varie très peu, ce qui assure une marche régulière de la distillation. La puissance de chauffage est d'autant plus élevée que la concentration saline est elle-même plus élevée; dans les conditions indiquées, la puissance est d'environ 1 000 Watts.

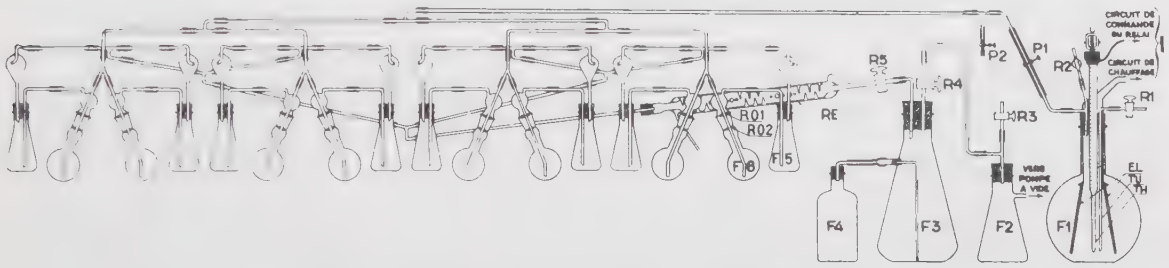


Fig. I. — SCHÉMA DE L'APPAREIL A DISTILLATION

Le remplissage du ballon est effectué par le robinet R1, un vide partiel étant établi à l'intérieur de l'appareil. Le tube plongeur TU a pour rôle d'empêcher les abaissements de pression trop importants qui seraient suivis d'une vaporisation brutale pouvant occasionner la rupture du ballon. Ce dispositif est nécessaire lorsque la source de chaleur est située à l'extérieur du ballon; son fonctionnement est le suivant : lorsque la pression diminue dans le ballon, la vapeur d'eau renfermée dans le tube plongeur s'en échappe et traverse la solution, ce qui provoque l'ébullition; l'augmentation de pression qui en résulte dans le ballon, s'accompagne du reflux de la solution à l'intérieur du tube. Ces cycles sont très rapides et entretiennent une ébullition régulière. Il est quelquefois nécessaire d'en amorcer la mise en route en faisant entrer en peu d'air par le robinet R1. Dans l'appareil de YOVANOVITCH, l'ébullition est régularisée par l'introduction continue de bulles d'air dans le générateur de vapeur; mais ceci oblige à maintenir constamment en action le dispositif à vide. A la sortie du générateur la vapeur d'eau est dirigée vers les huit ballons à entraînement (F6); elle parcourt, pour atteindre chacun d'eux, la même longueur de tubes. Ceci assure un refroidissement uniforme et par suite une température identique à l'entrée de tous les ballons.

Les ballons (F6) reçoivent la suspension de terre et la quantité de soude nécessaire au déplacement de l'ammoniac; leur capacité est de 250 cm³. Ils s'adaptent sur le dispositif d'entraînement au moyen de rodages normalisés enduits de graisse aux silicones. Deux rondelles de caoutchouc (RO1 et RO2), distantes des parois de 2 mm, sont fixées sur le tube plongeur amenant la vapeur dans les ballons. Elles empêchent les projections de liquide vers l'intérieur de la boule de verre et l'orifice de sortie.

Les fioles d'Erlenmeyer à large col (F5) ont une capacité de 250 cm³, elles reçoivent une quantité connue d'acide sulfurique destinée à fixer l'ammoniac provenant des ballons à entraînement. Ces fioles s'adaptent sur l'appareil au moyen d'un bouchon de caoutchouc supportant le tube d'admission de la vapeur et une ampoule de sécurité.

La vapeur d'eau est ensuite amenée au réfrigérant de Vigreux (R6) et parcourt pour l'atteindre, une même longueur de tubes à partir de chacune des ampoules de sécurité. Le réfrigérant est en position inclinée, la vapeur barbote dans l'eau de condensation qui s'accumule à sa partie inférieure. Une fiole à vide d'une contenance de 5 litres (F5) fait suite au réfrigérant auquel elle est reliée par le robinet R5. L'ensemble constitué par le réfrigérant et la fiole à vide, joue le rôle de condenseur de la vapeur. Il maintient pendant toute la durée de la distillation, un barbotage énergique dans les récipients F3 et F4, sans qu'il soit nécessaire d'entretenir la dépression au moyen de la pompe à vide.

Le collecteur d'eau est constitué par un flacon d'une contenance de 1 litre (F4) relié à la fiole à vide par un tube débouchant dans le fond de celle-ci. L'eau de condensation qui s'accumule dans le réfrigérant et la fiole à vide, passe dans le flacon F4 au moment de l'ouverture du robinet R5, au début de la distillation, les récipients F3 et F4 étant alors en dépression tandis que l'ensemble de l'appareil est à la pression atmosphérique.

Le vide est obtenu par une pompe à palette. Le robinet R3 permet de rétablir la pression atmosphérique à l'entrée de la pompe à vide chaque fois que celle-ci est arrêtée, ce qui évite les retours d'huile. Les robinets R4 et R5 ont une voie de 6 mm pour assurer un débit de vapeur suffisant.

Les pinces de Mohr à vis P1 et P2 sont destinées au nettoyage des tubes d'admission de la vapeur dans les ballons F6, lorsque, à la suite de la rupture d'un ballon à entraînement, le contenu de celui-ci est envoyé dans les tubes. Pour cela la pince P1 est fermée et de l'eau distillée est envoyée dans les tubes par le tuyau que ferme la pince P2.

b) Fonctionnement.

Les fioles F3 sont placées en premier sur l'appareil; elles reçoivent une quantité connue d'acide sulfurique N/25, quatre gouttes d'indicateur de Tashiro et de l'eau distillée. Le niveau de solution est établi à la même hauteur dans toutes les fioles F3 en service. L'indicateur est préparé en mélangeant un volume d'une solution aqueuse (environ 0,7 %) de bleu de méthylène dans l'alcool à 95° et 5 volumes d'une solution aqueuse (environ 0,25 %) de rouge de méthyle dans l'alcool à 95°. Les ballons F6 reçoivent le contenu des tubes qui ont été placés dans le réfrigérateur à l'issue de la réaction enzymatique. Les suspensions de sol sont versées dans les ballons à l'aide d'une pissette de 25 cm³ qui est chaque fois entièrement vidée, afin que le volume de solution soit le même dans tous les ballons; ceci assure un débit de vapeur identique dans ces huit ballons et, par suite un entraînement uniforme de l'ammoniac. Chaque ballon reçoit 2,5 cm³ de soude 4N immédiatement avant d'être placé sur l'appareil à distiller. Le lavage provoque brièvement la sédimentation des suspensions de sol, les tubes sont alors plongés dans l'eau contenue pour permettre la liquéfaction.

Au moment de la mise en place des récipients F3 et F6, tous les robinets sont en position fermée et les fioles F3 et F4 sont en dépression, le vide étant maintenu dans celles-ci à l'issue de chaque distillation. La pompe à vide est mise en action, le robinet R4 est ensuite ouvert, puis le robinet R5, l'ouverture de ce dernier est effectuée rapidement de manière à provoquer une aspiration énergique des vapeurs des ballons F6. Le robinet R5 est fermé dès que le barbotage est établi dans les ballons F6 et que les bulles de vapeur arrivant dans la solution acide des fioles F3, s'y résorbent. La pompe à vide est maintenue quelques instants encore en action, puis le robinet R4 est fermé.

La distillation est conduite à cette allure pendant 5 minutes, puis le robinet R5 est progressivement ouvert afin d'établir une vitesse de barbotage plus énergique pendant les 15 minutes suivantes. Cette double allure de la distillation a pour but d'éviter les pertes d'ammoniac au cours des premières minutes de la distillation, pendant lesquelles le quasi-totalité de l'ammoniac est distillée. Il faut se rappeler d'ailleurs que pour les quantités d'ammoniaque inférieures à 10 cm³ N/25. Pour arrêter la distillation, le robinet R5 est fermé, puis l'air est progressivement introduit dans l'appareil par le robinet R2. Après rétablissement de la pression atmosphérique, les ballons F6 sont retirés, on procède ensuite à l'enlèvement des fioles d'Erlenmeyer F3. L'excès d'acide sulfurique est dosé par la soude N/25.

c) Dosage de l'ammonium dans les suspensions de sol

A l'issue de la réaction enzymatique, une partie de l'ammoniaque présent dans le milieu se trouve fixée par les colloïdes du sol. La fixation est due, d'une part, à la réorganisation de l'ammonium à l'intérieur des feuillets de l'argile et, d'autre part, à l'adsorption de cet ion sur les sites échangeables à la surface de l'argile et des colloïdes humiques. La libération des cations échangeables ne peut être obtenue que difficilement ; elle nécessite l'addition de sodium sous forme de chlorure ou hydroxyde. Les cations échangeables peuvent être extraits ensuite par une solution de chlorure de potassium 2 N. Les résultats obtenus ne sont pas toujours satisfaisants. Cependant, la méthode est l'ammoniac, il est possible de procéder plus rapidement et efficacement directement sur distillation à partir de la suspension du sol ; on réalise ainsi en une seule opération la solubilisation et le dosage de l'ammonium. Nous avons adopté cette technique pour la mesure de l'activité de l'asparaginase. [illegible] et [illegible] montrent que la distillation de l'ammoniac en présence de sol, peut s'accompagner d'une élimination de l'ion ammonium, sans doute plus important en présence de potassium qu'en présence de sodium. Aussi, à la minéralisation qui se produit au cours de la réaction enzymatique, s'ajoute celle qui survient au cours de la distillation.

Afin de déterminer la proportion d'ammonium qui échappe ainsi à la mesure, lors de l'évaluation de l'activité de l'asparaginase du sol, l'asparagine a été remplacée par une quantité connue de sulfate d'ammonium dans le milieu utilisé pour la mesure. Les résultats de l'expérience sont rapportés à la figure 10. Il ressort de l'examen de la figure que le pH 9,2 milieu nécessaire à l'ensemble de la réaction. Cependant une baisse du milieu acide peut devenir d'autant plus importante que le pH est plus élevé. Avec les complexes protéiques (PBK) à PBK5, on retrouve (PBH1) à PBH4). Les mêmes quantités d'ammonium que celles introduites. La présence de protéines n'a donc pas d'incidence sur la minéralisation contrairement à ce qui a été [illegible] et [illegible]. Notons que la distillation est précédée par distillation de la suspension de sols acides différents au cours de la mesure de l'activité de l'asparaginase.

Fig. 10. — [illegible]

[illegible]

Au tableau 4 ont été mentionnées les proportions d'ammonium rétrogradé déterminées graphiquement à partir des résultats rapportés à la figure II. Le sol FP, plus riche en argile que le sol PR, a un pouvoir de rétention plus élevé que ce dernier. La texture du sol peut donc intervenir directement sur la mesure. Toutefois ces proportions résultent d'une rétrogradation qui s'est poursuivie pendant 21 heures à 49°, en présence d'une quantité constante d'ammonium, contrairement à ce qui a lieu au cours de la réaction enzymatique, où l'ammonium n'apparaît que progressivement dans le milieu. De plus, la libération des ions ammonium, pendant la réaction, se produit alors que l'argile est saturée par les ions du tampon, ce qui doit freiner la rétrogradation de l'ammonium. Afin de vérifier l'importance de ce facteur, l'expérience suivante a été réalisée :

	Ammonium rétrogradé en % de l'ammonium ajouté au milieu					
pH	6	7	8	9	10	11
SOLS PR	0,3	1,1	3,4	6,4	8,4	9,1
SOLS FP	3,6	5,7	10,0	16,3	22,2	27,1

Tableau 4. — Proportions d'ammonium rétrogradé mesurées graphiquement à partir des résultats de la figure II.

3 g de sol FP sont mélangés avec 3 cm³ d'eau et 10 cm³ de solution-tampon PB3 (pH 7,6 dans le surnageant); après agitation le mélange est placé au bain-marie à 49° pendant 1/2, 1, 2, 4 ou 6 heures puis on ajoute 2 cm³ d'une solution de sulfate d'ammonium 0,175N; la suspension est ensuite réagitée et replacée à 49° pendant 21 heures. L'expérience a été également effectuée avec le tampon sodique PBNa3 ainsi qu'avec le tampon potassique PBK3, de même concentration et sensiblement de même pH que le tampon PB3.

Les résultats sont rapportés au tableau 5 dont la première ligne concerne les tubes témoins dans lesquels la solution de sulfate d'ammonium a été ajoutée avant l'addition de sol. Ces résultats montrent que la prolongation de la durée de contact du sol dans la solution-tampon, préalablement à l'addition de sulfate d'ammonium, a contribué à réduire la perte d'ammonium par rétrogradation. On observe cependant, une rétrogradation plus importante après séjour préalable de 1/2 heure, que dans le témoin. Ceci suggère l'intervention d'un autre facteur qui réside vraisemblablement dans la dispersion des colloïdes du sol lors de la deuxième agitation. La dispersion est probablement d'autant plus importante que l'agitation a été effectuée après un contact préalable de plus longue durée. On peut donc présumer que la diminution d'intensité de la rétrogradation serait, sans l'intervention de ce facteur, encore plus marquée que ne le font apparaître les résultats mentionnés au tableau 5.

Durée du traitement préalable	Désignation du tampon		
	PBNa3	PBK3	PB3
0	8,08	8,00	8,06
30 minutes	8,00	7,96	7,98
1 heure	8,10	8,06	8,08
2 heures	8,11	8,11	8,11
4 heures	8,15	8,13	8,13
6 heures	8,21	8,15	8,15

Tableau 5. — Influence de la durée du séjour préalable du sol dans la solution, sur la rétrogradation. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium retrouvé.

L'apparition progressive de l'ammonium dans le milieu et cette réduction de l'aptitude du sol à la rétrogradation, concourent à limiter les pertes d'ammonium au cours de la réaction enzymatique. Celles-ci doivent donc être nettement plus faibles que celles qui apparaissent au tableau 4. D'autre part, le pH optimum d'action de l'asparaginase des sols se situe entre les valeurs 7 et 8, comme cela est indiqué plus loin, donc en deçà de la zone de rétrogradation maximum. Il en résulte que les déterminations comparatives de l'activité de l'asparaginase des sols, peuvent être effectuées dans des conditions acceptables en ce qui concerne la mesure de l'ammonium. Pour les déterminations effectuées à pH plus élevé, on devra tenir compte du fait qu'une fraction de l'ammonium, plus ou moins importante suivant les sols, est soustraite à la mesure.

La recherche des conditions de distillation permettant le déplacement maximum d'ammonium a été effectuée sur le sol FP à cause de la grande aptitude de ce sol à la rétention de l'ammonium. 3 g de sol ont été mélangés avec 10 cm³ de solution-tampon PB3 et 5 cm³ de solution de sulfate d'ammonium 0,07N. Après un séjour de 21 heures à 49°, la distillation a été effectuée dans différentes conditions. Les résultats obtenus ont été rapportés aux tableaux 6, 7 et 8.

cm³ de soude ou de potasse 4N	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
NaOH 4N	7,25	8,00	8,06	8,06	8,09	8,08
KOH 4N	—	—	—	8,08	—	8,12

Tableau 6. — Influence, sur le déplacement de l'ammonium, de la quantité de soude ou de potasse 4N ajoutée à la suspension de sol. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25 retrouvé.

Durée de la distillation en minutes	10	15	20	25	30
Ammonium retrouvé, en cm³ N/25	8,02	8,10	8,09	8,12	8,11

Tableau 7. — Influence de la durée de la distillation sur le déplacement de l'ammonium. Distillation effectuée en présence de 2,5 cm³ de soude 4N.

Volume de solution dans les ballons, en cm³	42,5	52,5	62,5	72,5	82,5
Ammonium retrouvé, en cm³ N/25	8,08	8,07	8,05	8,05	8,04

Tableau 8. — Influence, sur le déplacement de l'ammonium, de la dilution de la soude dans la suspension de sol.

L'examen du tableau 6 montre qu'un volume de 1,5 cm³ de soude 4N est suffisant pour déplacer l'ammonium; au-delà de ce volume, il n'y a pas d'augmentation significative de la quantité d'ammonium déplacé. La distillation en présence de potasse n'apporte pratiquement pas de modification.

Du tableau 7 il ressort que la distillation est complète après 15 minutes; déjà après 10 minutes presque tout l'ammoniac a été entraîné.

Au tableau 8, sont mentionnés les résultats obtenus avec différentes dilutions de la soude dans les ballons à entraînement. Le déplacement de l'ammonium n'est pas sensiblement modifié lorsque 10, 20, 30 ou 40 cm³ d'eau sont ajoutés au mélange constitué par 2,5 cm³ de soude 4N, 15 cm³ de suspension de sol et 25 cm³ d'eau employés pour faire passer le contenu des tubes dans les ballons. Une seule dilution était réalisée chaque fois dans la série des huit ballons afin que le débit de vapeur soit le même dans chacun d'eux.

Le déplacement de l'ammonium n'est pas affecté par un séjour des tubes pendant 1, 2 ou 3 jours dans le compartiment à glace du réfrigérateur, à l'issue de la réaction. Il est donc possible de différer éventuellement la distillation.

Les conditions retenues pour la distillation de l'ammoniac provenant de l'hydrolyse enzymatique de l'asparagine dans les sols, sont les suivantes : le contenu des tubes est versé dans les ballons à entraînement à l'aide de 25 cm³ d'eau; 2,5 cm³ de soude 4N sont ajoutés immédiatement avant la mise en place des ballons sur l'appareil à distillation. La distillation est poursuivie pendant 20 minutes.

4. Témoins de la mesure

Des valeurs obtenues par la mesure, doivent être déduites celles qui résultent de la formation par voie chimique du corps mesuré et de la présence initiale de celui-ci dans le milieu. La détermination de ces valeurs est habituellement réalisée en effectuant deux témoins de la mesure, l'un sans matériel enzymatique, l'autre sans substrat.

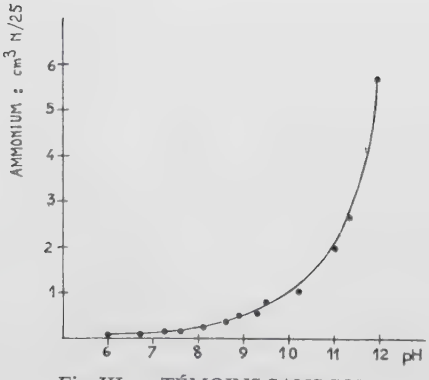


Fig. III. — TÉMOINS SANS SOL

5 cm³ d'eau + 10 cm³ de solution-tampon PB contenant 2,5 % d'asparagine; 21 heures à 49° (expérience rapportée au tableau 9).

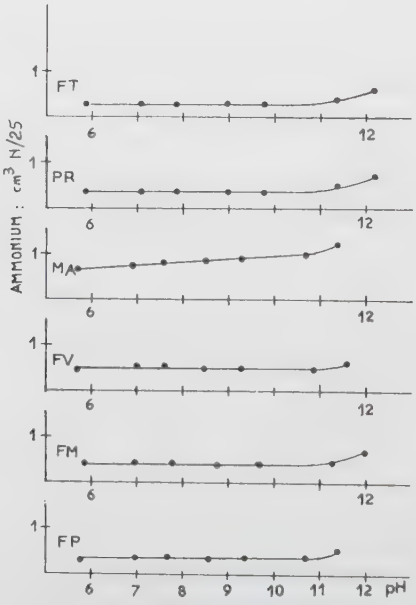


Fig. IV. — TÉMOINS SANS ASPARAGINE

5 cm³ d'eau + 10 cm³ de solution-tampon PB + 3 g de sol FP, FM, FV ou 5 g de sol MA, PR ou FT; 21 heures à 49° (expérience rapportée au tableau 10).

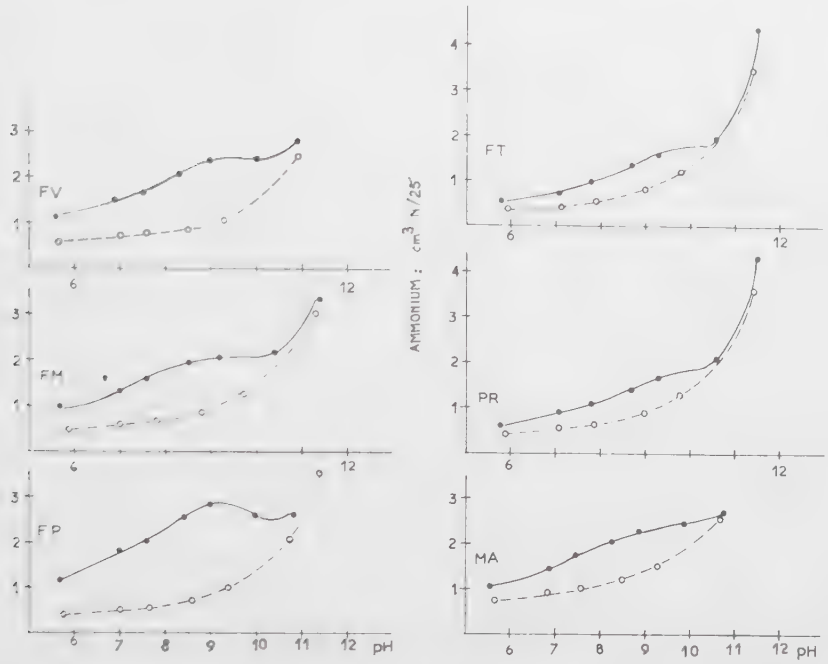


Fig. V. — VALEURS TÉMOINS OBTENUES PAR LES DEUX MÉTHODES
21 heures à 49°

○ Somme du témoin sans sol et du témoin sans asparagine, à différents pH (fig. III et IV).

● Témoin effectué avec sol chauffé et asparagine : 5 cm³ d'eau + 10 cm³ de solution-tampon contenant 2,5 % d'asparagine + 3 g de sol FP, FM, FV ou 5 g de sol MA, PR ou FT préalablement maintenus à l'autoclave à 100° pendant 30 minutes (expérience rapportée au tableau 11).

Désignation du tampon	pH	Températures			
		43°	46°	49°	52°
PB1	6,0	0,09	0,09	0,10	0,10
1b	6,7	0,10	—	0,10	0,11
PB2	7,2	0,10	0,13	0,15	0,15
2b	7,6	0,16	0,17	0,15	0,18
PB3	8,1	0,20	0,22	0,26	0,32
3b	8,6	0,28	0,30	0,35	0,45
PB4	8,9	0,39	0,49	0,52	0,68
4b	9,3	—	0,53	0,57	0,80
PB5	9,5	0,57	0,65	0,81	1,00
5b	10,2	0,65	0,87	1,04	1,30
PB6	11,0	1,17	1,48	2,00	2,58
6a	11,3	1,47	2,10	2,65	3,45
6b	11,5	1,93	2,64	—	4,40
PB7	11,9	—	4,40	5,75	7,16

Tableau 9. — Témoins sans sol : 5 cm³ d'eau + 10 cm³ de solution-tampon contenant 2,5 % d'asparagine; 21 heures à différentes températures. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25. Les nombres suivis d'une lettre, dans la première colonne, correspondent aux tampons de pH intermédiaire préparés par mélange de deux solutions-tampon de la gamme.

Sol	Tampon	pH	Température				Sol	Tampon	pH	Température			
			43°	46°	49°	52°				43°	46°	49°	52°
FP	PB1	5,8	0,30	—	0,29	0,33	MA	PB1	5,7	0,62	0,64	0,65	0,66
	PB2	7,0	0,29	0,33	0,35	0,39		PB2	6,9	0,69	0,70	0,75	0,76
	PB3	7,7	0,32	0,33	0,35	0,39		PB3	7,6	0,74	0,75	0,80	0,90
	PB4	8,6	0,30	0,33	0,35	0,35		PB4	8,5	0,78	0,79	0,84	0,90
	PB5	9,4	0,30	0,31	0,36	0,35		PB5	9,3	0,82	0,79	0,84	—
	PB6	10,7	0,30	0,32	0,38	0,39		PB6	10,7	0,86	0,92	1,00	0,97
	PB7	11,4	0,40	—	0,53	0,55		PB7	11,4	0,97	1,16	1,22	1,25
FM	PB1	5,9	0,35	0,35	0,39	0,37	PR	PB1	5,9	0,34	—	0,33	0,35
	PB2	7,0	0,40	0,42	0,42	0,38		PB2	7,1	0,35	0,34	0,37	0,37
	PB3	7,8	0,40	0,39	0,43	0,40		PB3	7,9	0,34	0,39	0,36	0,35
	PB4	8,8	0,36	0,39	0,39	0,39		PB4	9,0	0,33	0,35	0,34	0,35
	PB5	9,7	0,35	—	0,38	0,35		PB5	9,8	0,35	0,34	0,35	0,35
	PB6	11,3	0,39	0,41	0,45	0,48		PB6	11,4	0,41	0,46	0,50	0,52
	PB7	12,0	0,60	0,65	0,69	0,77		PB7	12,2	0,50	0,60	0,69	0,73
FV	PB1	5,7		0,44	0,46	0,47	FT	PB1	5,9	0,25	—	0,25	0,27
	PB2	7,0		—	0,55	0,52		PB2	7,1	0,25	0,23	0,24	0,25
	PB3	7,6		0,51	0,55	0,52		PB3	7,9	0,23	0,25	0,26	0,25
	PB4	8,5		0,48	0,49	0,52		PB4	9,0	0,22	0,26	0,27	0,25
	PB5	9,3		—	0,49	0,49		PB5	9,8	0,23	0,26	0,25	0,31
	PB6	10,9		0,40	0,48	0,44		PB6	11,4	0,37	0,33	0,38	0,46
	PB7	11,6		0,55	0,60	0,58		PB7	12,2	0,43	0,54	0,60	0,64

Tableau 10. — *Témoins sans asparagine :* 5 cm³ d'eau + 10 cm³ de solution-tampon + 3 g de sol FP, FM, FV ou 5 g de sol MA, PR ou FT; 21 heures à différentes températures. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

Les témoins réalisés en l'absence de sol (tableau 9 et fig. III) montrent que l'hydrolyse chimique de l'asparagine est très faible de pH 6 à pH 8, puis augmente rapidement pour atteindre des valeurs importantes au-dessus de pH 11. L'hydrolyse est accrue par l'élévation de la température.

Les témoins réalisés en l'absence de substrat sont très peu affectés par le pH du milieu, ainsi que par la température (tableau 10 et fig. IV). Les valeurs obtenues restent généralement inférieures à 0,5 cm³, exception faite pour le sol de marais (MA) dans lequel l'ammoniac s'accumule par suite de conditions anaérobies.

Les enzymes étant thermolabiles, il est possible d'établir plus simplement la valeur totale à soustraire de la mesure enzymatique en effectuant, dans les mêmes conditions que celle-ci, un témoin unique, dans lequel l'asparagine est mise en présence de sol préalablement traité par la chaleur. Au tableau 11 sont rapportées les valeurs des témoins effectués de cette manière, avec du sol préalablement maintenu pendant 30 minutes à 100° : 3 g ou 5 g de sol suivant l'échantillon sont mis en tubes à fond plat de 1 cm de diamètre et 7 cm de hauteur; ces tubes sont placés au dessus de l'eau en ébullition, dans un autoclave sur lequel le couvercle est simplement posé. Comme pour les témoins précédents sans sol, la température influe nettement sur la production d'ammonium. Cependant l'action du pH est assez différente, un palier plus ou moins marqué se présente entre pH 9 et pH 10,5.

A la figure V sont rapportées les valeurs totales à soustraire de la mesure enzymatique, obtenues par les deux méthodes : d'une part, en effectuant séparément un témoin sans sol et un témoin sans asparagine dont les valeurs sont ensuite additionnées et, d'autre part, en effectuant un témoin unique avec asparagine et sol préalablement traité par la chaleur. De l'examen de la figure, il ressort

Sol	Tampon	pH	Température				Sol	Tampon	pH	Température			
			43°	46°	49°	52°				43°	46°	49°	52°
FP	PB1	5,7	0,92	1,02	1,15	1,35	MA	PB1	5,6	0,97	1,00	1,07	1,15
	PB2	7,0	1,39	1,65	1,81	1,92		PB2	6,9	1,22	1,40	1,45	1,60
	PB3	7,6	1,63	1,93	2,02	2,25		PB3	7,5	1,41	1,54	1,75	1,85
	PB4	8,4	2,05	2,20	2,45	2,82		PB4	8,3	1,66	1,87	2,05	2,19
	PB5	9,0	2,29	2,60	2,83	3,07		PB5	8,9	1,92	2,17	2,31	2,52
	PB6	10,0	2,00	2,31	2,61	2,89		PB6	9,9	2,08	2,30	2,45	2,89
	PB7	10,8	1,94	2,37	2,60	3,15		PB7	10,8	2,18	2,44	2,70	3,20
FM	PB1	5,7	0,72	0,85	0,95	1,12	PR	PB1	5,8	0,55	0,58	0,60	0,73
	PB2	7,0	1,14	1,22	1,30	1,46		PB2	7,1	0,78	0,87	0,92	1,09
	PB3	7,6	1,22	1,41	1,57	1,75		PB3	7,8	0,94	1,00	1,10	1,25
	PB4	8,5	1,55	1,75	1,93	2,15		PB4	8,7	1,19	1,35	1,42	1,65
	PB5	9,2	1,75	1,95	2,08	2,36		PB5	9,3	1,39	1,57	1,68	1,95
	PB6	10,4	1,74	1,87	2,14	2,63		PB6	10,6	1,57	1,82	2,10	2,55
	PB7	11,4	2,29	3,05	3,36	4,44		PB7	11,5	2,22	3,34	4,35	5,19
FV	PB1	5,6	0,91	0,97	1,12	1,20	FT	PB1	5,8	0,42	0,50	0,55	0,61
	PB2	6,9	1,20	1,32	1,50	1,55		PB2	7,1	0,63	0,70	0,72	0,90
	PB3	7,5	1,41	1,56	1,65	1,85		PB3	7,8	0,82	0,90	1,00	1,10
	PB4	8,3	1,69	1,85	2,05	2,20		PB4	8,7	1,10	1,17	1,35	1,20
	PB5	9,0	1,87	2,11	2,38	2,50		PB5	9,3	1,22	1,37	1,61	1,84
	PB6	10,0	1,87	2,13	2,40	2,68		PB6	10,6	1,49	1,75	1,97	2,48
	PB7	10,9	2,01	2,32	2,82	3,30		PB7	11,5	2,79	3,45	4,35	5,37

Tableau 11. — *Témoins réalisés avec sol chauffé et asparagine :* 5 cm³ d'eau + 10 cm³ de solution-tampon contenant 2,5 % d'asparagine + 3 g de sol FP, FM ou FV, ou 5 g de sol MA, PR ou FT préalablement maintenus à l'autoclave à 100° pendant 30 minutes; 21 heures à différentes températures. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

que les deux méthodes ne sont en accord pour aucun des 6 échantillons de sol; la deuxième donnant des valeurs nettement plus importantes entre pH 6 et pH 11.

A priori, la recherche des causes de cette différence conduit vers deux hypothèses : d'une part, la formation d'ammoniac à partir de la matière organique du sol pendant le traitement à l'autoclave, et d'autre part, la destruction incomplète de l'asparaginase du sol au cours de ce traitement thermique. La première hypothèse peut être rapidement écartée. En effet, le sol chauffé à 100°, puis maintenu pendant 21 heures à 49° en présence de tampon, donne à la distillation, une quantité d'ammonium légèrement inférieure à celle qui est obtenue dans les mêmes conditions avec l'échantillon de sol non traité par la chaleur (tableau 12).

Traitement	Désignation du tampon	Sols					
		FP	FM	FV	MA	PR	FT
Sol maintenu à 100° pendant 30 mn	PB2	0,22	0,26	0,37	0,70	0,30	0,22
	PB3	0,25	0,29	0,40	0,75	0,30	0,22
Sol non chauffé.....	PB2	0,34	0,42	0,55	0,75	0,37	0,24
	PB3	0,34	0,43	0,55	0,80	0,36	0,26

Tableau 12. — *Influence du chauffage préalable du sol sur la production d'ammonium dans les témoins sans substrat:* 5 cm³ d'eau + 10 cm³ de solution-tampon + 3 g de sol FP, FM, FV, ou 5 g de sol MA, PR ou FT; 21 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

La deuxième hypothèse a été contrôlée en faisant varier la température et la durée du chauffage lors du traitement préalable du sol. L'expérience a été effectuée sur l'échantillon δ FP; les résultats sont rapportés au tableau 13. L'augmentation de la durée du chauffage du sol à 100°, provoque une diminution progressive mais peu importante de l'hydrolyse de l'asparagine dans le témoin (colonne 2). L'humectation du sol par addition de 4 cm³ d'eau à 5 g de terre, avant le traitement à 100°, n'a pas apporté non plus de réduction importante de l'hydrolyse (deux dernières lignes de la colonne 2). Par contre, l'augmentation de 20° de la température de chauffage préalable du sol a provoqué une diminution très appréciable de l'hydrolyse de l'asparagine (5e ligne de la colonne 2) sans toutefois la ramener à une valeur aussi basse que celle qui est atteinte en l'absence de sol (0,2 cm³ d'ammonium N/25 en 21 heures à 49° : fig. III, pH 7,5). Cette action du sol, qui n'est pas éliminée par un traitement de 1 heure à 120° ne peut donc être attribuée à une réaction enzymatique. La deuxième hypothèse se trouve ainsi infirmée.

	Durée et température de chauffage	Ammonium provenant du sol chauffé (1)	Ammonium provenant de l'hydrolyse de l'asparagine en présence de sol chauffé (2)	Ammonium produit dans les témoins réalisés avec sol chauffé + asparagine (3)
Sol mis sec à l'autoclave	30 mn à 100°.....	0,36	1,96	2,32
	1 heure à 100°.....	0,38	1,82	2,20
	1 heure 30 à 100°....	0,39	1,55	1,94
	2 heures à 100°.....	0,41	1,41	1,82
	1 heure à 120°.....	0,86	0,87	1,73
Sol humidifié avant séjour à l'autoclave	30mn à 100°.....	0,36	1,64	2,00
	1 heure à 100°.....	0,37	1,54	1,91

Tableau 13. — *Influence de la température et de la durée de chauffage du sol, sur la production d'ammonium dans les témoins.* Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

Colonne (1): 5 g de sol δFP chauffé + 5 cm³ d'eau + 10 cm³ de solution-tampon PB3; 21 heures à 49°.

Colonne (2): différence entre les résultats correspondants des colonnes (1) et (3).

Colonne (3): 5 g de sol δFP chauffé + 5 cm³ d'eau + 10 cm³ de solution-tampon PB3 contenant 2,5 % d'asparagine, 21 heures à 49°.

L'absence de concordance entre les deux méthodes d'évaluation des témoins ne peut donc provenir d'une minéralisation de l'azote à l'autoclave, ni d'une destruction incomplète de l'asparaginase. Ceci permet d'envisager une troisième hypothèse : l'existence de réactions chimiques génératrices d'ammonium, intervenant entre l'asparagine et des substances du sol. D'après les résultats rapportés à la colonne 2 du tableau 13, la production d'ammonium à partir d'asparagine est d'autant moins importante que le traitement thermique du sol a été plus énergique : il en résulte que ces substances seraient altérables par la chaleur. Plusieurs essais d'extraction ont été effectués dans le but de mettre en évidence ces substances. Au tableau 14 sont mentionnés les résultats de l'expérience suivante :

Extraction à froid : 36 g de sol FP sont percolés sur filtre de Buchner par 180 cm³ de solution-tampon PB2 ou PB3 diluée aux 2/3. Le filtrat est remis sur le filtre pour clarification, puis recueilli. 15 cm³ de filtrat correspondent à 3 g de terre.

Extraction à chaud : Les mêmes opérations ont été effectuées avec la solution amenée à 49°. Le filtrat est ramené à 49° avant d'être remis sur le filtre.

Solutions chauffées à 100° : 75 cm³ de chaque filtrat sont maintenus pendant 30 minutes à 100°, dans l'autoclave.

On dispose ainsi de huit solutions, 15 cm³ de chacune d'elles sont soumis à la distillation, après un séjour de 21 heures à 49°. Les résultats correspondants sont mentionnés aux deux premières colonnes du tableau. Ils constituent les valeurs témoins des séries suivantes.

Traitement		Ammonium provenant de la solution d'extraction		Ammonium provenant de l'asparagine dissoute dans la solution d'extraction	
		tampon PB2	tampon PB3	tampon PB2	tampon PB3
Extraction à froid	Solution non chauffée.....	0,07	0,09	0,26	0,30
	Solution maintenue pendant 30 mn à 100°	0,09	0,11	0,13	0,13
Extraction à chaud	Solution non chauffée.....	0,11	0,13	0,31	0,48
	Solution maintenue pendant 30 mn à 100°	0,10	0,11	0,20	0,31

Tableau 14. — *Extraction de substances réagissant chimiquement avec l'asparagine, dans le sol:* les résultats ont été obtenus à partir de 15 cm³ de solution d'extraction correspondant à 3 g de sol FP; ils sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

0,583 g d'asparagine sont dissous dans 35 cm³ de chacune des huit solutions, ce qui correspond à la concentration habituellement utilisée, soit 1,66 %. 15 cm³ de chaque solution renfermant l'asparagine sont soumis à la distillation après un séjour de 21 heures à 49°. Des valeurs obtenues on retranche, d'une part, les valeurs correspondantes des deux premières colonnes qui représentent l'ammonium provenant des solutions elles-mêmes et, d'autre part, les quantités d'ammonium provenant de l'hydrolyse spontanée de l'asparagine, dans les mêmes conditions de température et de pH. Ces dernières sont données à la figure III : 0,15 cm³ d'ammonium N/25 à pH 7 (pour la solution PB2) et 0,23 cm³ à pH 7,7 (pour la solution PB3). Les résultats obtenus sont mentionnés aux deux dernières colonnes du tableau.

Ces résultats établissent la présence, dans le sol, de substances solubles dans le tampon, réagissant chimiquement avec l'asparagine pour donner de l'ammonium. La production d'ammonium est moins importante dans les solutions préalablement chauffées à 100°. Ces substances sont donc, comme prévu, altérées par la chaleur. La quantité maximum d'ammonium obtenue est de 0,48 cm³ N/25, or les différences relevées entre les deux méthodes d'évaluation des témoins sont respectivement de 1,30 cm³ et de 1,50 cm³ N/25 aux pH 7,0 et 7,7 (fig. V, sol FP). L'extraction a donc été très incomplète; elle correspond dans les meilleures conditions à 32 % de la totalité de ces substances. Toutefois on doit noter qu'elle est accrue par l'élévation de la température et du pH. Ceci a permis d'améliorer les conditions d'extraction dans une deuxième expérience.

120 g de sol FP. sont mélangés avec 600 cm³ de solution tampon PB5 diluée aux 2/3. Le mélange est maintenu pendant 2 heures à 49°, puis filtré. Le filtrat est soumis aux mêmes déterminations que dans l'expérience précédente. Les résultats sont rapportés au tableau 15. Le pH étant ici de 8,7, l'hydrolyse spontanée de l'asparagine donne 0,4 cm³ d'ammonium N/25 (fig. III).

La production d'ammonium est ici de 1,13 cm³ N/25, contre 1,90 cm³ pour la quantité maximum, telle qu'elle résulte de l'estimation de la différence entre les deux méthodes d'évaluation des témoins (fig. V, sol FP, pH 8,7). L'extraction a donc permis le passage en solution de 60 % des substances présentes dans le sol, soit presque le double de ce qui avait été obtenu précédemment.

Traitement	Ammonium provenant de la solution d'extraction	Ammonium provenant de l'asparagine dissoute dans la solution d'extraction
Solution non chauffée	0,20	1,13
Solution maintenue pendant pendant 30 mn à 100°	0,21	0,63

Tableau 15. — *Extraction de substances réagissant chimiquement dans le sol avec l'asparagine.*
Les résultats ont été obtenus à partir de 15 cm³ de solution d'extraction, correspondant à 3 g de sol FP; ils sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

La nature des substances extraites n'a pas été recherchée; cependant il est certain qu'il ne s'agit pas ici d'un passage en solution de l'asparaginase du sol. En effet le chauffage à 100° effectué avant l'addition d'asparagine, a inactivé seulement la moitié environ des substances extraites; or dans ces conditions, l'asparaginase de levure en solution ou contenue dans les cellules, est entièrement inactivée. Dans certaines études concernant l'élution d'enzymes du sol, l'activité enzymatique des extraits était très faible; on peut donc se demander dans quelle mesure elle ne correspondait pas à une légère action chimique des extraits sur le substrat. Une destruction chimique de l'acide urique est signalée par M. MARTIN-SMITH (76); elle serait due à la présence de Cu cuivrique.

Le début de palier que présentent les courbes obtenues en fonction du pH, avec le sol maintenu pendant 30 minutes à 100° indique une zone d'activité optimum de ces substances, soit que leur solubilisation y soit plus importante, soit que la réaction dépende du pH de la suspension. Toutefois l'inflexion des courbes est probablement accentuée par la rétrogradation de l'ammonium, celle-ci étant d'autant plus importante que le pH est plus élevé.

En conclusion, la valeur témoin à soustraire de la mesure enzymatique ne peut être correctement déterminée que par une mesure dans laquelle l'asparagine et le tampon sont mis en présence de sol préalablement chauffé. Cette manière de procéder s'est trouvée pleinement justifiée par la suite, lors de l'étude de l'influence du nitrate sur l'activité de l'asparaginase du sol, relatée ultérieurement.

Les résultats des mesures de la réaction enzymatique rapportés dans cette étude de l'asparaginase du sol, correspondent généralement à la différence entre les productions d'ammonium obtenues, d'une part, avec le sol traité à l'autoclave pendant 30 minutes à 100° et, d'autre part, avec le sol non chauffé; la solution utilisée étant la même dans les deux cas. Lorsqu'il en est autrement ceci est chaque fois indiqué.

Origine de l'ammonium libéré au cours de la mesure.

L'ammonium libéré par action de l'asparaginase provient de la fonction amide de l'asparagine. L'enzyme laisse intact le radical amine qui se retrouve dans la molécule d'acide aspartique libéré simultanément (111). Afin de caractériser la réaction ayant lieu dans le sol au contact de la solution d'asparagine, nous avons recherché l'origine de l'ammonium produit par cette réaction. Pour cela, l'hydrolyse de la fonction amide de l'asparagine par l'acide sulfurique (12/p 520), a été effectuée à l'issue du séjour de la suspension de sol à 49°; tout l'azote amidé de l'asparagine est ainsi amené

sous forme d'ammonium. Si l'ammonium libéré au contact du sol, lors du séjour de la suspension à 49°, ne provient pas de la fonction amide, la quantité globale d'ammonium obtenue après hydrolyse acide sera supérieure à celle qui correspond à la totalité de l'azote amidé de l'asparagine. Par contre, elle lui sera égale si la réaction ayant lieu dans le sol est due à la présence d'asparaginase. En fait l'hydrolyse de la fonction amide par l'acide sulfurique n'est pas complète; elle dépend de la concentration en acide et de la durée de chauffage. Il est donc nécessaire d'effectuer comparativement une hydrolyse acide dans la solution n'ayant pas été en contact avec le sol.

25 g de sol sont mélangés avec 50 cm³ de solution-tampon PB3 (traitement T) ou de la même solution contenant de l'asparagine à la concentration 2 % (traitement A). Le mélange est maintenu à 49° pendant 14 heures 30 minutes puis on lui ajoute 75 cm³ d'acide sulfurique 4,3N. La suspension est ensuite filtrée, puis on percole le sol par de l'acide sulfurique N/10 jusqu'à ce que le volume total de filtrat soit de 500 cm³. Le déplacement de l'ammonium est alors complet comme l'indique l'absence de coloration du réactif de NESSLER en présence des dernières gouttes de filtrat. Pour obtenir l'hydrolyse presque totale de l'asparagine, une grande quantité d'acide sulfurique est nécessaire; c'est ce qui conduit à en ajouter en excès avant la filtration.

50 cm³ de filtrat sont mélangés avec 5 cm³ d'acide sulfurique 16,5*N* puis maintenus en ébullition pendant 5 heures, dans un ballon de l'appareil à distillation surmonté d'un réfrigérant ascendant. Après refroidissement et immédiatement avant la distillation, 35 cm³ de soude 4*N* sont ajoutés au contenu des ballons. Un violent dégagement de gaz carbonique, tendant à faire refluer la solution vers le générateur de vapeur, se produit initialement. Il résulte de l'action de l'acide sulfurique présent dans la solution sur le carbonate apporté par la soude. Un robinet a dû être placé avant le tube plongeur de chacun des ballons; il n'est ouvert qu'après le dégagement de gaz carbonique.

Les différences de production d'ammonium entre les traitements T et A sont rapportées aux deux premières lignes du tableau 16. Elles correspondent à 50 cm³ de filtrat, soit 2,5 g de terre et 100 mg d'asparagine. Dans la dernière colonne sont mentionnés les résultats obtenus dans les mêmes conditions en l'absence de sol. L'hydrolyse acide commence à froid, dès l'addition d'acide sulfurique; l'ammonium provenant de la réaction enzymatique ne peut donc être mesuré dans les filtrats. Il est évalué directement sur la suspension de sol (résultats rapportés à la troisième ligne du tableau).

Sols		FP	MA	PR	RI	JA	SA	SB	Sans sol
Hydrolyse acide	Ébullition 2 heures 45 mn.....	16,04	15,83	16,12	16,09	16,08	16,16	16,01	16,04
	Ébullition 5 heures .	16,15	16,15	16,22	16,11	16,17	16,10	16,06	16,05
Sans hydrolyse acide.....		4,23	0,82	2,50	0,93	1,42	1,58	0,58	—

Tableau 16. — *Hydrolyse de la fonction amide de l'asparagine.* Les quantités mentionnées concernent la différence entre les traitements T et A; l'ammonium préexistant dans le sol se trouve ainsi déduit. Les résultats correspondent à 100 mg d'asparagine; ils sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

En 5 heures d'ébullition, la production d'ammonium n'est que très légèrement supérieure à celle qui a lieu en 2 heures 45 minutes. Or celle-ci est encore inférieure de 0,5 cm³ à la quantité correspondant à l'hydrolyse totale de la fonction amide (16,6 cm³), l'hydrolyse acide est donc une réaction d'équilibre. En présence de quantités moins importantes d'acide sulfurique, la production d'ammonium était plus faible : en 2 heures d'ébullition elle atteignait 15,5 cm³ pour une addition de 5 cm³ d'acide sulfurique 8,25N, et 13,5 cm³ sans addition complémentaire d'acide.

Les quantités d'ammonium présentes dans les différents filtrats, après 5 heures d'ébullition, sont très voisines, contrairement à ce qui a lieu dans les suspensions de sol à l'issue de la réaction enzymatique. L'acide sulfurique a donc égalisé les productions d'ammonium; son action et celle du sol sont complémentaires. Il en résulte que cette dernière a également provoqué l'hydrolyse de la fonction amide de l'asparagine et doit être attribuée à la présence d'asparaginase. Ceci est confirmé par le fait que les quantités d'ammonium contenues dans les filtrats, après hydrolyse acide, sont presque identiques à celle qui est obtenue dans la solution n'ayant pas été en contact avec le sol. La production d'ammonium est cependant généralement supérieure dans les filtrats, peut être à cause de l'action hydrolysante de substances du sol, mises en évidence lors de l'étude des témoins. Les résultats obtenus montrent en outre que la fonction amine de l'acide aspartique libéré par la réaction, n'a pas été hydrolysée, soit à cause de la teneur très faible des sols en aspartase, soit à cause de conditions peu favorables à l'activité de cette enzyme.

Influence de divers facteurs sur la mesure de l'activité de l'asparaginase.

1. Température — pH — Nature des cations

Au tableau 17 sont mentionnées les productions d'ammonium obtenues pour différentes valeurs de la température et du pH. Les conditions pour lesquelles la production est la plus importante ne sont pas les mêmes pour tous les sols; elles sont cependant voisines. Il est donc possible de retenir,

Sol	Tampon	pH	Température				Sol	Tampon	pH	Température			
			43°	46°	49°	52°				43°	46°	49°	52°
FP	PB1	5,7	4,63	5,12	5,10	5,35	MA	PB1	5,6	0,45	0,50	0,57	0,54
	PB2	7,0	7,04	7,16	7,10	7,60		PB2	6,9	1,17	1,11	1,23	1,27
	PB3	7,6	7,18	7,31	7,21	*7,66*		PB3	7,5	1,25	1,33	1,34	1,43
	PB4	8,4	6,72	6,64	6,54	6,62		PB4	8,3	1,27	1,30	1,37	*1,51*
	PB5	9,0	5,44	5,52	5,44	5,42		PB5	8,9	1,21	1,30	1,43	1,45
	PB6	10,0	3,59	3,59	3,69	3,55		PB6	9,9	0,81	0,84	1,07	0,85
	BP7	10,8	2,47	2,32	2,77	2,37		PB7	10,8	0,63	0,58	0,84	0,74
FM	PB1	5,7	5,68	5,83	5,72	5,93	PR	PB1	5,8	2,94	3,19	3,29	3,18
	PB2	7,0	9,22	*9,39*	9,18	9,15		PB2	7,1	4,66	*4,84*	4,83	4,46
	PB3	7,6	9,21	9,29	8,76	8,49		PB3	7,8	4,51	4,47	4,26	4,10
	PB4	8,5	7,13	7,43	7,04	7,10		PB4	8,7	3,48	3,45	3,40	3,25
	PB5	9,2	5,41	5,65	5,54	5,57		PB5	9,3	2,59	2,65	2,77	2,71
	PB6	10,4	3,16	3,24	3,44	3,12		PB6	10,6	1,44	1,44	1,49	1,33
	PB7	11,4	1,88	1,68	2,00	1,51		PB7	11,5	0,96	0,45	0,22	0,24
FV	PB1	5,6	4,58	4,19	4,58	4,70	FT	PB1	5,8	3,03	3,26	3,59	3,50
	PB2	6,9	11,63	10,81	11,38	12,86		PB2	7,1	4,50	4,88	*4,89*	4,73
	PB3	7,5	13,16	12,57	12,70	*13,69*		PB3	7,8	4,34	4,42	4,41	4,14
	PB4	8,3	13,18	12,94	12,90	13,66		PB4	8,7	3,58	3,57	3,65	3,76
	PB5	9,0	12,46	11,96	10,96	12,27		PB5	9,3	2,71	2,84	2,89	2,82
	PB6	10,0	7,75	8,43	7,30	7,82		PB6	10,6	1,47	1,51	1,66	1,40
	PB7	10,9	5,79	5,84	5,36	5,30		PB7	11,5	0,54	0,43	0,37	0,26

Tableau 17. — *Activité de l'asparaginase des sols, en fonction de la température et du pH.* 5 cm³ d'eau + 10 cm³ de solution-tampon contenant 2,5 % d'asparagine + 3 g de sol FP, FM, FV ou 5 g de sol MA, PR, ou FT; 21 heures à différentes températures. Aux quantités d'ammonium obtenues ont été retranchées les valeurs correspondantes des témoins mentionnées au tableau 11. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

pour la mesure de la teneur des sols en asparaginase, des conditions moyennes; celles-ci sont représentées par la température de 49° et la solution-tampon PB3.

Les quantités d'ammonium produites en 21 heures à 49°, en présence des solutions-tampon PB, PBNa et PBK, sont rapportées à la figure VI. Avec les solutions-tampon PBNa, les pH des suspensions sont légèrement décalés vers l'acidité; par contre, les pH sont plus élevés en présence des solutions PBK; ceci résulte des différences, précédemment mentionnées, entre les pH des trois gammes de solutions-tampon. L'ensemble des résultats obtenus se situe sensiblement sur une même courbe; la nature des cations n'a donc pas d'incidence sur la réaction enzymatique. Ces résultats montrent, d'autre part, que la nature des cations n'intervient pas sur la rétrogradation de l'ammonium produit au cours de la réaction enzymatique, ce qui confirme les résultats obtenus lors de l'addition de sulfate d'ammonium dans les suspensions de sols.

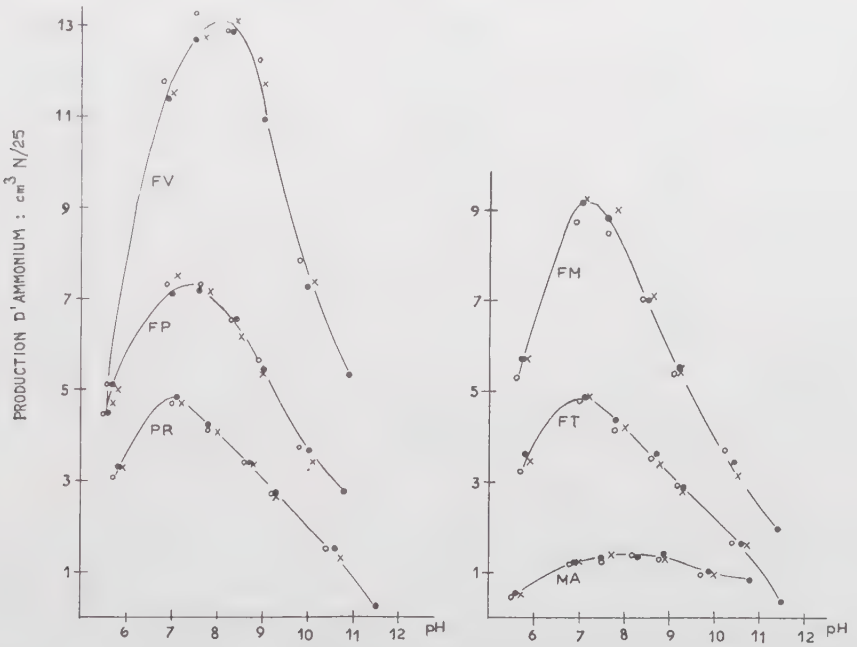


Fig. VI. — ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE DES SOLS EN FONCTION DU pH
expérience rapportée au tableau 17

● Tampon PB
○ Tampon PBNa
× Tampon PBK

3 g de sol FP, FM, FV ou 5 g de sol MA, PR ou FT + 5 cm³ d'eau + 10 cm de solution-tampon contenant 2,5 % d'asparagine; 21 heures à 49°.

2. Durée de la réaction

3 g de sol FP, FM, FV ou 5 g de sol MA, PR ou FT ont été mélangés avec 5 cm³ d'eau et 10 cm³ de solution-tampon PB3 contenant 2,5 % d'asparagine, puis maintenus à 49° pendant 1, 6, 11, 16, 21, 26 ou 31 heures. A la figure VII sont rapportées les productions d'ammonium correspondantes, diminuées des valeurs témoins obtenues dans les mêmes conditions avec du sol chauffé.

Trois phases se présentent au cours du déroulement de la réaction; elles sont de durée variable suivant les sols : la première s'étend sur 1 heure pour les sols PR et MA, 2 heures pour les sols FV et FT, et 3 heures pour les sols FM et FP. Au cours de cette période la vitesse de la réaction diminue progressivement. La phase suivante, pendant laquelle la vitesse de la réaction est constante, s'étend jusqu'à la 16e heure pour le sol FV, la 21e heure pour les sols FM, FT et PR et la 26e heure pour le sol FP; elle n'est pas encore terminée à la 31e heure pour le sol MA. Au cours de la troisième

phase, la vitesse diminue à nouveau. Ceci n'est pas conforme à l'allure habituelle des réactions enzymatiques; la phase rectiligne devrait, en effet, se présenter au début de la réaction. Il est possible que l'hydrolyse de l'asparagine dans les sols soit la résultante des activités de plusieurs asparaginases d'origine différente et d'inégale stabilité. La phase initiale pourrait alors traduire l'inactivation de l'une ou de quelques unes d'entre elles. Une diminution de la perméabilité des cellules contenant l'asparaginase ou une modification des interactions de l'enzyme dans les cellules pourrait également rendre compte de la réduction de la vitesse de la réaction au cours des premières heures.

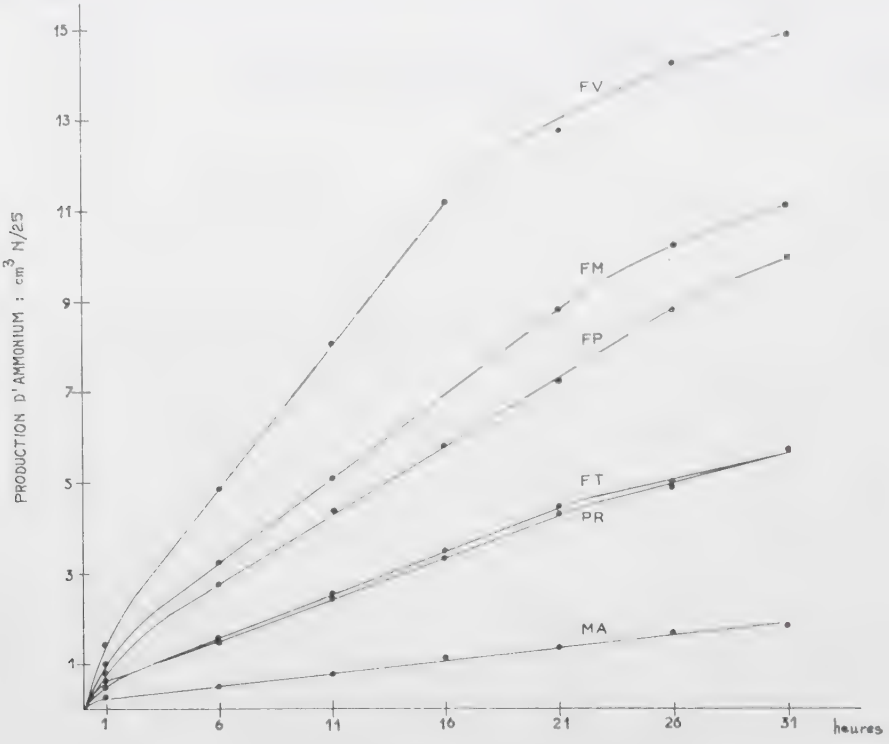


Fig. VII. — INFLUENCE DE LA DURÉE DE LA RÉACTION SUR LA PRODUCTION D'AMMONIUM

3 g de sol FP, FM, FV ou 5 g de sol MA, PR ou FT + 5 cm³ d'eau + 10 cm³ de solution-tampon PB3 contenant 2,5 % d'asparagine.

Le point d'intersection de l'axe des ordonnées et de la droite représentant la deuxième phase de la réaction, permet d'évaluer la quantité d'ammonium correspondant à la différence de vitesse de réaction entre les deux premières phases. Elle est respectivement de 0,95, 1,0, 1,05, 0,45 et 0,40 cm³ d'ammonium N/25 pour les sols FP, FM, FV, PR et FT. Dans la deuxième partie de cette étude, relative à la localisation de l'asparaginase dans les sols, les résultats rapportés à la figure XXV et concernant le traitement préalable des sols pendant 30 minutes à 30° dans l'eau ou la solution d'asparagine, font apparaître une diminution d'activité par rapport au sol non traité (té). Cette diminution correspond respectivement, pour les mêmes sols que précédemment, à 0,80, 1,0, 0,70, 0,45 et 0,70 cm³ d'ammonium N/25, quantités assez voisines de celles qui traduisent la différence de vitesse de réaction entre les deux premières phases de la réaction. Les diminutions d'activité mises en évidence dans ces deux expériences pourraient donc concerner un même processus intervenant dès que le sol est imbibé, indépendant de la température, entre 30 et 49°, et de la présence du substrat. L'hypothèse de l'intervention d'enzymes d'inégale stabilité pourrait alors être écartée.

En outre, il ne semble pas qu'interviennent avec quelque importance, sur l'activité de l'asparaginase, des substances du sol, solubilisées dans les conditions de la mesure. En effet, il ressort de l'examen du tableau 18 que la mesure de l'activité enzymatique de mélanges de sols, est généralement peu différente de la quantité d'ammonium correspondant à la somme des activités de chaque sol, bien que les sols soient très différents entre eux et que l'inégalité de la durée de la phase initiale traduise un comportement propre à chacun d'eux.

Sols utilisées	Production d'ammonium		Différence relative
	mesurée	calculée	
FP (1,5 g) + FM (1,5 g)	6,83	7,98	— 14,4 %
— — + FV —	9,74	9,95	— 2,0 %
— — + PR (2,5 g)	5,13	5,73	— 10,4 %
— — + FT —	5,24	5,80	— 9,6 %
— — + MA —	4,13	4,27	— 3,3 %
FM (1,5 g) + FV (1,5 g)	10,29	10,73	— 4,1 %
— — + PR (2,5 g)	5,83	6,51	— 10,4 %
— — + FT —	5,79	6,58	— 12,0 %
— — + MA —	4,50	5,05	— 11,0 %
FV (1,5 g) + PR (2,5 g)	8,62	8,48	+ 1,6 %
— — + FT —	8,86	8,56	+ 3,5 %
— — + MA —	7,59	7,02	+ 8,1 %
PR (2,5 g) + FT (2,5 g)	3,91	4,33	— 9,7 %
— — + MA —	2,74	2,80	— 2,1 %
FT (2,5 g) + MA (2,5 g)	2,71	2,82	— 3,9 %

Tableau 18. — *Activité enzymatique des mélanges de sol:* Les poids de terre indiqués sont ajoutés à 5 cm³ d'eau et 10 cm³ de solution-tampon PB3 contenant 2,5 % d'asparagine. Le mélange est ensuite maintenu pendant 21 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

La durée de la réaction, choisie pour la mesure de la teneur des sols en asparaginase, est de 21 heures; elle se situe vers la fin de la période pendant laquelle la vitesse de l'hydrolyse est constante, pour la majorité des sols.

Le fait que la phase linéaire occupe la plus grande partie du séjour au bain-marie montre que, dans les conditions de la mesure, la rétrogradation de l'ammonium est nulle ou excessivement faible. De l'étude de la rétrogradation de l'ammonium dans les suspensions de terre, en présence de sulfate d'ammonium, il ressortait que, lors de la mesure enzymatique, les pertes d'ammonium doivent être peu élevées à cause de l'apparition progressive de cet élément dans le milieu; cette conclusion est donc confirmée.

3. Concentration en substrat et poids de terre

2, 4, 6 ou 8 g de sol FP ont été mélangés avec 5 cm³ d'eau et 10 cm³ de solution-tampon PB3 contenant 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 ou 3 % d'asparagine; soit, pour les 15 cm³ de solution, des concentrations respectives de 0,33, 0,66, 1, 1,33, 1,66 ou 2 % d'asparagine. Ces mélanges sont maintenus pendant 21 heures à 49°. A la figure VIII, sont rapportées les productions d'ammonium diminuées des valeurs-témoins obtenues dans les mêmes conditions avec le sol chauffé.

En présence de tampon PB3, la concentration en asparagine n'a qu'une incidence très faible sur le pH, comme cela ressort de la comparaison des valeurs-témoins obtenues avec et sans asparagine à différents pH (tableaux 10 et 11). Par contre, l'augmentation du poids de terre dans le

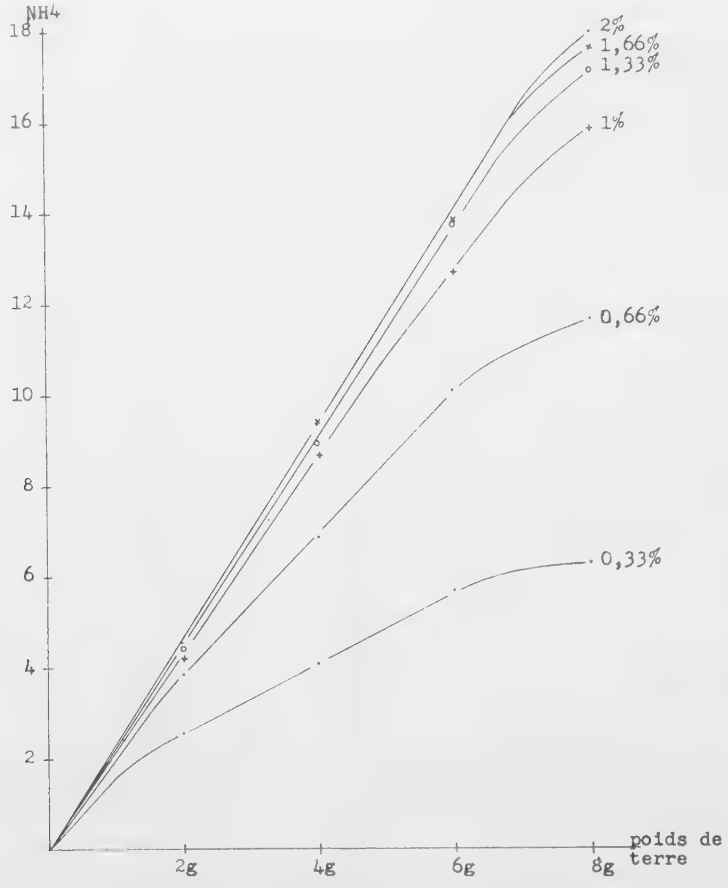


Fig. VIII. — INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT ET DE LA QUANTITÉ DE TERRE SUR LA PRODUCTION D'AMMONIUM

Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25. 2, 4, 6 ou 8 g de sol FP + 5 cm³ d'eau + 10 cm³ de solution-tampon PB3; 21 heures à 49°.

milieu, provoque un abaissement assez important du pH, lequel demeure cependant dans la zone correspondant au sommet de la courbe d'activité de l'asparaginase en fonction du pH.

L'inflexion des droites correspondant aux concentrations 1,66 % et 2 % d'asparagine, semble résulter de l'impossibilité d'agiter efficacement la suspension de sol, le volume des tubes étant presque entièrement occupé par le mélange en présence de 8 g de terre. Avec 1 % d'asparagine, l'inflexion ayant lieu en deçà de 6 g de terre, pourrait résulter de l'abaissement de la concentration en substrat au cours de la réaction. Après 21 heures, en présence de 6 g de terre, la teneur du milieu en asparagine est ici voisine de 0,5 % et la production d'ammonium est inférieure de 8 % seulement à celle qui est obtenue à partir de 2 % d'asparagine. Pour la concentration initiale de 0,66 % et 2 g de terre, 0,5 % d'asparagine se retrouve dans le milieu après 21 heures, la production d'ammonium est ici inférieure de 12 % seulement à celle qui est obtenue à partir de 2 % d'asparagine. La vitesse de la réaction est donc assez peu affectée par la concentration en susbtrat lorsque celle-ci demeure supérieure à 0,5 %. Cette limite correspond à une production d'ammonium de 29 cm³ N/25 pour une concentration initiale de 1,66 % en asparagine, concentration retenue pour la technique de mesure.

En présence de 8 g de terre et pour les concentrations initiales de 0,33 % et 0,66 % en asparagine, la production d'ammonium est sensiblement proportionnelle à ces concentrations, ce qui traduit une hydrolyse presque complète du substrat. Effectivement, pour la concentration initiale de 0,33 %, l'hydrolyse complète de la fonction amide de l'asparagine aurait donné 8,33 cm³ d'ammonium N/25, quantité qui n'est pas très éloignée de 6,95 cm³ représentant la production totale obtenue, y compris la valeur du témoin.

L'augmentation de la vitesse de la réaction proportionnellement au poids de terre, pour les concentrations élevées en substrat, montre que le sol intervient seulement par sa teneur en asparaginase.Ceci confirme qu'il n'y a pas solubilisation de substances intervenant sur l'activité enzymatique.

Étude statistique des résultats.

En ce qui concerne le déplacement par distillation puis la titration de l'ammonium se trouvant dans la suspension de sol, la précision de la mesure a été évaluée à partir de suspensions renfermant du sulfate d'ammonium. 3 g de sol FP sont mélangés avec 10 cm³ de solution-tampon PB3 et 5 cm³ de solution de sulfate d'ammonium 0,07N; le mélange est ensuite maintenu pendant 21 heures à 49°. Dans ces conditions l'écart-type de 18 mesures est de 0,03 cm³ N/25 pour une quantité moyenne d'ammonium de 8,08 cm³ N/25.

Les résultats des mesures enzymatiques effectuées avec 15 cm³ de solution contenant le même tampon et 1,66 % d'asparagine, sont nettement plus dispersés. Ainsi l'écart-type de 24 mesures est de 0,11 cm³ N/25 pour le sol FP et celui de 16 mesures effectuées sur le sol FV atteint 0,30 cm³ N/25, les moyennes respectives étant de 7,20 et de 12,70 cm³ d'ammonium N/25. Ces deux sols sont ceux pour lesquels la dispersion des résultats est la plus importante. L'agitation mécanique des suspensions de sol pendant 30 minutes, sur un agitateur alternatif, avant le séjour au bain-marie, ne modifie pas la production d'ammonium ni la dispersion des résultats pour le sol FP; par contre, la production d'ammonium est augmentée de 11 % et l'écart-type est ramené à 0,18 cm³ N/25, pour le sol FV.

Les mesures ont toujours été effectuées en quatre répétitions et les productions d'ammonium mentionnées correspondent à la moyenne des résultats; les valeurs-témoins ont été évaluées par une seule mesure. Les quantités d'ammonium rapportées lors de l'étude de l'adsorption et de l'élution de l'asparaginase de levure dans les sols, résultent cependant d'une mesure unique. A cause de la faible stabilité de l'asparaginase de levure purifiée, les mesures comparatives devaient être groupées dans une même série, ce qui ne permettait pas d'effectuer des répétitions simultanées. Mais la dispersion des résultats est ici très réduite; en effet, à cinq opérations d'adsorption puis d'élution réalisées sur le sol βJA, correspondait un écart-type de 0,05 cm³ N/25 pour une production moyenne de 9,20 cm³ N/25.

II. — ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE EN L'ABSENCE DE BORATE MISE EN ÉVIDENCE D'UNE DEUXIÈME ASPARAGINASE

Influence de la composition des solutions-tampon sur les témoins de la mesure.

La méthode d'évaluation des témoins des mesures, exposée précédemment, doit être réexaminée, les solutions employées ici étant différentes des solutions antérieurement utilisées. Les tampons ne renferment pas de bore; leur préparation est donnée aux tableaux 19, 20 et 21. Les

valeurs des témoins des mesures effectuées avec ces solutions-tampon sont rapportées à la figure IX; elles se situent un peu au-dessus de la courbe obtenue avec les tampons PB, quelques résultats en sont même nettement éloignés. De plus la dispersion des résultats est plus importante en l'absence de bore : l'écart-type correspondant à 8 mesures effectuées avec 5 g de sol δFP, chauffés pendant 30 minutes à 100°, est de 0,41 cm³ d'ammonium N/25 en présence de tampon P3 à la concentration 0,8 × 2/3 M, alors qu'il n'est que de 0,07 cm³ en présence de tampon PB3 à la concentration 0,4 × 2/3 M. Il est vraisemblable que ces perturbations ayant lieu en l'absence de bore résultent de l'activité de microorganismes non détruits par le traitement préalable du sol à 100°. Pour cette raison, l'activité de l'asparaginase mesurée en l'absence de bore, a été évaluée au moyen de la courbe correspondant aux valeurs des témoins obtenues avec les tampons boriques.

Désignation des tampons	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Solution Pa.....	360 cm³	310 cm³	236 cm³	200 cm³	160 cm³	140 cm³	100 cm³
Solution Pb.....	80 cm³	130 cm³	204 cm³	240 cm³	280 cm³	300 cm³	340 cm³

Tableau 19. — *Préparation des solutions-tampon-phosphate de concentration* 0,8 M.
Solution Pa: 217,8 g de PO^4H^2K amenés à 2 litres.
Solution Pb: 217,8 g de PO^4H^2K + 800 cm³ de soude 4 N amenés à 2 litres.

Désignation des tampons	PF1	PF2	PF3	PF4	PF5	PF6
Solution Fa	360 cm³	240 cm³	168 cm³	120 cm³	72 cm³	24 cm³
Solution Fb.....	0	120 cm³	192 cm³	240 cm³	288 cm³	336 cm³

Tableau 20. — *Préparation des solutions-tampon-phosphate-fluorure, de concentration* 0,6 M *pour chacun des deux éléments.*
Solution Fa: 81,70 g de PO^4H^2K + 25,2 g de FNa amenés à 1 litre.
Solution Fb: 81,70 g de PO^4H^2K + 25,2 g de FNa + 224 cm³ de soude 4 N amenés à 1 litre.

Désignation des tampons	PAs1	PAs2	PAs3	PAs4	PAs5	PAs6
Solution Asa	30 cm³	0	0	0	0	0
Solution Asb.....	30 cm³	48 cm³	30 cm³	24 cm³	18 cm³	12 cm³
Solution Asc	0	12 cm³	30 cm³	36 cm³	42 cm³	48 cm³

Tableau 21. — *Préparation des solutions-tampon-phosphate-arséniate de concentration* 0,6 M *pour chacun des deux éléments.*
Solution Asa: 46,78 g de AsO^4HNa^2, $7H^2O$ + 150 cm³ de PO^4H^3(M) amenés à 250 cm³.
Solution Asb: 187,1 g de AsO^4HNa^2, $7H^2O$ + 81,70 g de PO^4H^2K amenés à 1 litre.
Solution Asc: 187,1 g de AsO^4HNa^2, $7H^2O$ + 81,70 g de PO^4H^2K + 260 cm³ de soude 4 N amenés à 1 litre.

Désignation du tampon	Solution de PO^4H^3 (M)	PO^4H^2K	AsO^4H^2Na, 7 H^2O	BO^3H^3	NaOH(4 N)	CO^3Na^2 anhydre	Solution amenée à
PBAs1	400 cm³	0	312,0 g	24,73 g	0	0	1 litre
PBAs2	0	54,45 g	—	—	0	0	—
PBAs3	0	—	—	—	92 cm³	0	—
PBAs4	0	—	—	—	140 cm³	0	—
PBAs5	0	—	—	—	188 cm³	0	—
PBAs6	0	—	—	—	260 cm³	0	—
Cb1	300 cm³	13,61 g	0	24,73 g	0	106 g	1,5 litre
Cb2	0	54,45 g	0	—	0	—	—
Cb3	0	—	0	—	110 cm³	—	—
Cb4	0	—	0	—	180 cm³	—	—
CAs1.....	600 cm³	0	187,12	0	0	106 g	1,5 litre
CAs2.....	0	81,67	—	0	0	—	—
CAs3.....	0	—	—	0	130 cm³	—	—
CAs4.....	0	—	—	0	182 cm³	—	—

Tableau 22. — *Préparation des solutions-tampon-phosphate-borate-arséniate* (PBAs), *phosphate-borate-carbonate* (Cb) *et phosphate-arséniate-carbonate* (CAs).

PBAs: concentration 0,4 M pour le phosphate, et le borate et M pour l'arséniate.
Cb: concentration 0,4 × 2/3 M pour le phosphate et le borate et 0,66 M pour le carbonate.
CAs: concentration 0,4 M pour le phosphate et l'arséniate et 0,66 M pour le carbonate.

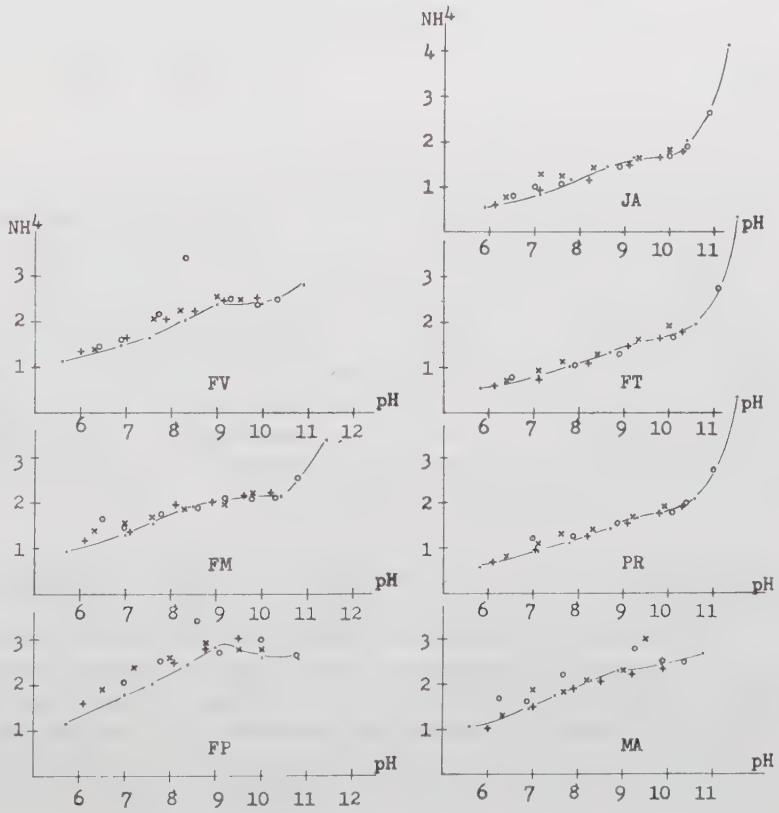


Fig. IX. — INFLUENCE DE LA COMPOSITION DES SOLUTIONS SUR LES TÉMOINS DE LA MESURE

3 g de sol FP, FM ou FV, ou 5 g de sol MA, PR, FT ou JA, maintenus pendant 30 minutes à 100°, dans un autoclave, + 5 cm³ d'eau, + 10 cm³ de l'un des tampons suivants, contenant 2,5 % d'asparagine. 21 heures à 49°. Les résultats sont exprimés en cm³ d'ammonium N/25.

· Tampon PB1 à PB7 0,4M
o — P1 à P6 0,8M
+ — PAs1 à PAs6 0,6M
× — PF1 à PF6 0,6M

Ces concentrations sont celles de chacun des anions entrant dans la composition du tampon.

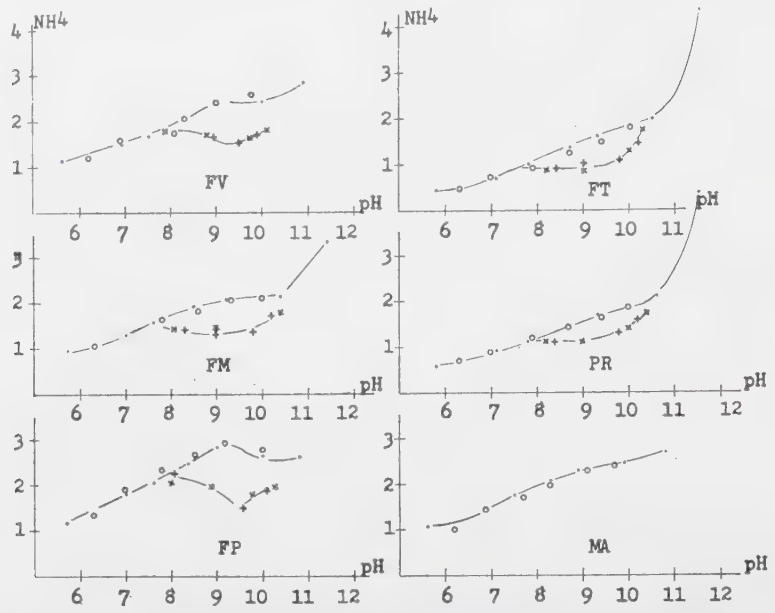


Fig. X. — INFLUENCE DE LA COMPOSITION DES SOLUTIONS, SUR LES TÉMOINS DE LA MESURE

3 g de sol FP, FM ou FV, ou 5 g de sol MA, PR ou FT, maintenus pendant 30 minutes à 100° dans un autoclave sont mélangés avec 15 cm³ de solution-tampon Cb1 à Cb4 ou CAs1 à CAs4 contenant 1,66 % d'asparagine, ou avec 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon PB1 à PB7 ou PBAs1 à PBAs6 et 1,66 % d'asparagine. 21 heures à 49°; les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

· Tampon PB1 à PB7
o — PBAs1 à PBAs6
\+ — Cb1 à Cb4
× — CAs1 à CAs4

On doit signaler en outre dans cette étude complémentaire des témoins des mesures, que la présence de carbonate de sodium à la concentration 0,66M (tampons Cb1 à Cb4 et CAs1 à CAs4 dont la préparation est indiquée au tableau 22) a pour effet de diminuer très sensiblement l'hydrolyse de l'asparagine dans les témoins de la mesure, entre pH 8,0 et pH 10,5 (fig. X). Les courbes correspondant aux témoins réalisés dans ces conditions se rapprochent des courbes représentant la somme des valeurs obtenues, d'une part, dans les solutions d'asparagine en l'absence de sol, et d'autre part, dans les suspensions de sol en l'absence d'asparagine (fig. V). L'influence du carbonate pourrait donc résider dans une action sur les substances solubles réagissant chimiquement avec l'asparagine, dont la présence a été mise en évidence précédemment. Les quantités d'ammonium produites par la réaction enzymatique en présence de carbonate ont, par suite, été calculées au moyen des témoins réalisés également en présence de carbonate.

Influence du borate sur l'activité de l'asparaginase des sols.

Les productions d'ammonium obtenues à différents pH en l'absence de borate avec les solutions-tampon contenant uniquement du phosphate ou du phosphate et du fluorure ou du phosphate et de l'arséniate, sont rapportées à la figure XI. Elles sont nettement plus importantes que celles qui sont obtenues avec les tampons boriques. Ceci traduit un effet dépressif du borate sur l'activité de l'asparaginase. Cet effet est d'autant plus accusé que le pH est plus élevé; au-dessous de pH 7,0 il est faible. Le borate agit à concentration peu élevée : son action n'est pas beaucoup plus

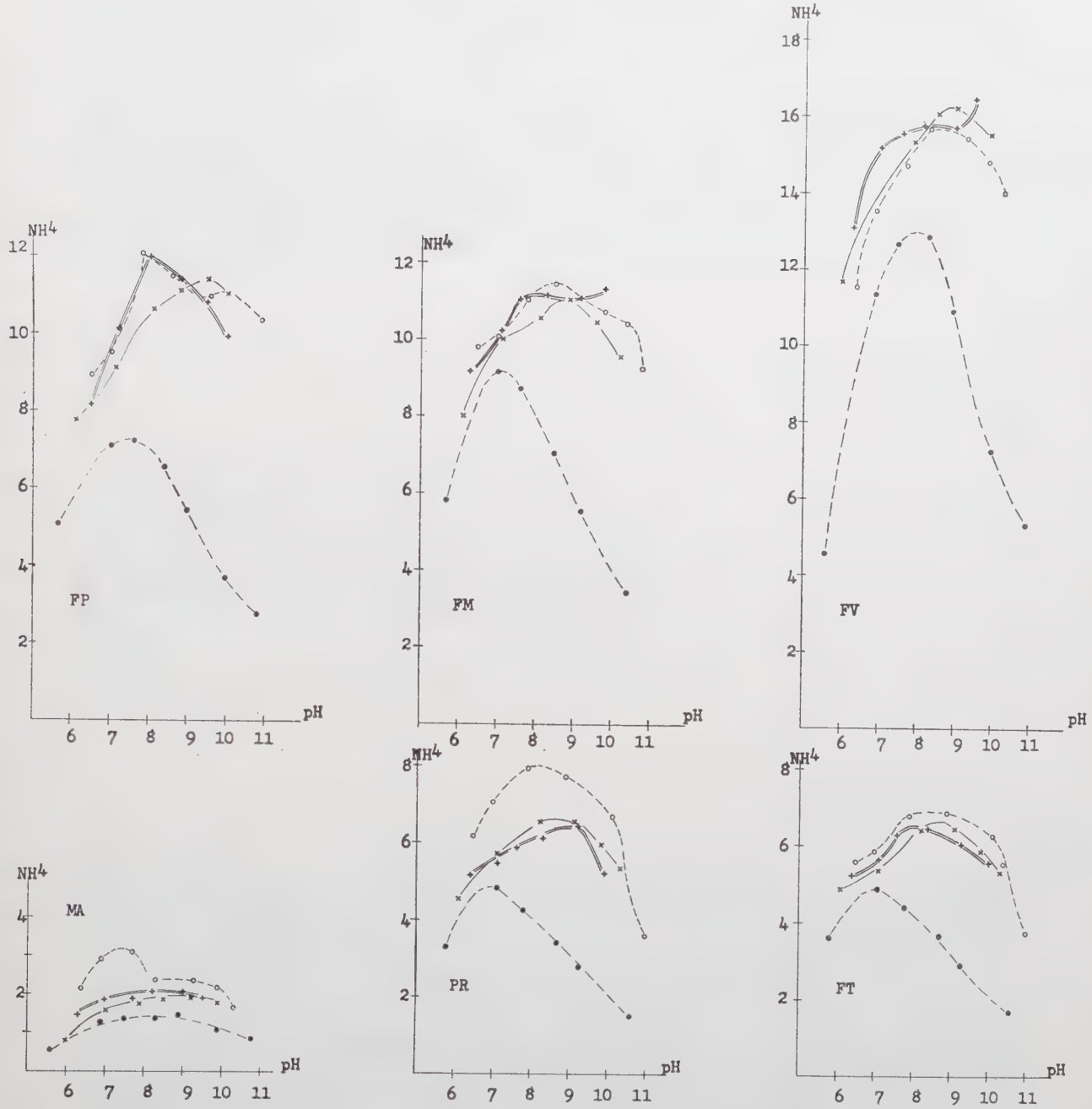


Fig. XI. — INFLUENCE DU BORE, SUR L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE DES SOLS

3 g de sol FP, FM ou FV, ou 5 g de sol MA, PR ou FT, + 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de l'une des solutions-tampon suivantes, et 1,66 % d'asparagine. 21 heures à 49°; les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

· Tampon PB1 à PB7; o Tampon P1 à P7; + Tampon PF1 à PF6; + Tampon PAs1 à PAs6.

importante à la concentration 0,4M qu'à la concentration 0,05M (fig. XII). La diminution d'activité enzymatique due à la présence de borate est inattendue, ce corps ayant été parfois utilisé comme tampon pour la mesure de l'activité de l'asparaginase (4) (16). A l'exception des sols MA et PR, le fluorure et l'arséniate n'apportent pas de modification importante de l'activité enzymatique, par rapport au phosphate seul.

Dans le but de déterminer si l'effet du borate est réversible, l'expérience suivante a été réalisée, dans laquelle le borate est masqué à différentes étapes de la réaction par addition de mannite : 3 g de sol FP sont mélangés avec 10 cm³ de solution-tampon contenant du phosphate et du borate aux concentrations respectives 0,4M et 0,15M (cette solution renferme 54,45 g de PO^4H^2K, 9,27 g de BO^3H^3 et 194 cm³ de soude 4N par litre), et 2,5 % d'asparagine. Le mélange est placé au bain-marie à 49° ; son pH est de 9,2. Après une durée de séjour variable à 49°, 5 cm³ de solution de mannite

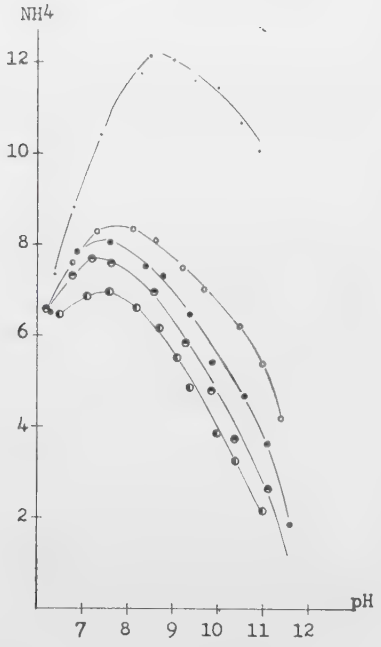


Fig. XII. — INFLUENCE DU BORE SUR L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE DU SOL FP

3 g de sol FP + 15 cm³ de solution tampon contenant 1,66 % d'asparagine, du phosphate à la concentration 0,2M et du borate à diverses concentrations. 21 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

Les solutions tampon sont préparées à partir de phosphate monopotassique, d'acide borique et de soude. Le pH des solutions est déterminé par la quantité de soude ajoutée.

Concentration en borate dans les 15 cm³ de solution : • néant ; ○ 0,05 ; ● 0,1M ; ◔ 0,2M ; ◐ 0,4M

à 15 % sont ajoutés au mélange, puis la réaction est poursuivie jusqu'à ce que sa durée totale soit de 21 heures. L'addition de mannite provoque un léger abaissement du pH qui se fixe à la valeur 8,8. Une série de mesures comparatives est effectuée, dans laquelle 5 cm³ d'eau sont ajoutés au lieu de la solution de mannite.

Dans la même expérience l'influence du borate a été recherchée à différentes étapes de la réaction; celle-ci est conduite initialement en présence de phosphate, puis le borate est ajouté au cours de la réaction. 3 g de sol FP sont mélangés avec 10 cm³ de solution-tampon contenant du phosphate à la concentration 0,4M (cette solution renferme 54,45 g de PO^4H^2K et 154 cm³ de soude 4N par litre), et 2,5 % d'asparagine. Le mélange est placé au bain-marie à 49° ; son pH est de 8,8. Après une durée de séjour variable au bain-marie, 5 cm³ de solution contenant du borate à la concentration 0,3M (cette solution renferme 9,27 g de BO^3H^3 et 40 cm³ de soude 4N par 500 cm³), sont ajoutés au mélange, puis la réaction est poursuivie jusqu'à ce que sa durée totale soit de 21 heures. L'addition de borate provoque une légère augmentation du pH qui se fixe à la valeur 9,4. Une série de mesures comparatives est effectuée, dans laquelle 5 cm³ d'eau sont ajoutés au lieu de la solution de borate.

Les résultats sont rapportés à la figure XIII/A; ils montrent que l'effet du bore disparaît en présence de mannite. Lorsque l'addition de mannite à la solution-tampon-phosphate-borate est effectuée au temps zéro de la réaction, la production d'ammonium est voisine de celle qui est obtenue en l'absence de bore. Pour les additions de mannite effectuées à différentes étapes de la réaction, les productions d'ammonium devraient se placer sur un segment de droite dont les extrémités auraient pour ordonnées les valeurs des mesures réalisées avec et sans bore. Les résultats obtenus se situent un peu au-dessus de cette droite; de plus, il se produit une augmentation de l'activité enzymatique, en l'absence de bore, dans les tubes recevant 5 cm³ d'eau au cours de la réaction. Ces deux faits pourraient traduire une synthèse d'asparaginase due à l'oxygénation du milieu lors de l'agitation effectuée après addition de 5 cm³ d'eau ou de solution de mannite. En présence d'arséniate (fig. XIII/B), ces décalages sont nettement moins importants.

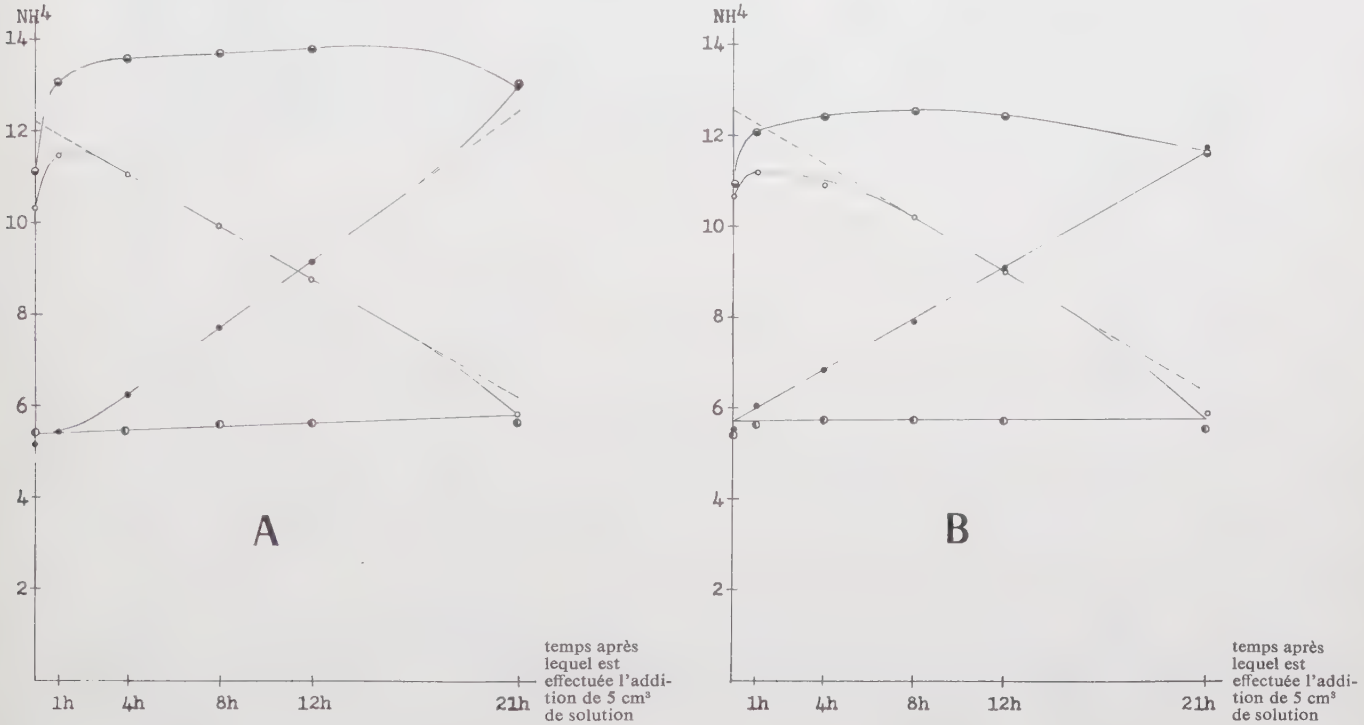


Fig. XIII. — REVERSIBILITÉ DE L'ACTION DU BORE SUR L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE

3 g de sol FP sont mélangés avec 10 cm³ de solution-tampon contenant 2,5 % d'asparagine, puis placés au bain-marie à 49°. Au temps zéro ou après 1 heure, 4 heures, 8 heures, 12 heures ou 21 heures, 5 cm³ d'une deuxième solution, sont ajoutés. Les tubes sont encore maintenus à 49° jusqu'à ce que la durée totale du séjour au bain-marie soit de 21 heures. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

A

- 3 g de sol + 10 cm³ de solution-tampon-phosphate (0,4M); puis on ajoute 5 cm³ de solution de borate (0,3M); pH du mélange : 9,4.
- ◒ 3 g de sol + 10 cm³ de la même solution-tampon-phosphate; puis on ajoute 5 cm³ d'eau; pH du mélange : 8,8.
- ○ 3 g de sol + 10 cm³ de solution-tampon-phosphate (0,4M)-borate (0,15M); puis on ajoute 5 cm³ de solution de mannite à 15 %; pH du mélange : 8,8.
- ◐ 3 g de sol + 10 cm³ de la même solution-tampon-phosphate-borate; puis on ajoute 5 cm³ d'eau; pH du mélange : 8,8.

B

- 3 g de sol + 10 cm³ de solution-tampon-phosphate (0,6M)-arséniate (0,6M); puis on ajoute 5 cm³ de solution de borate (0,3M); pH du mélange : 9,6.
- ◒ 3 g de sol + 10 cm³ de la même solution-tampon-phosphate-arséniate; puis on ajoute 5 cm³ d'eau; pH du mélange : 9,2.
- ○ 3 g de sol + 10 cm³ de solution-tampon-phosphate (0,6M)-arséniate (0,6M)- borate (0,15M); puis on ajoute 5 cm³ de solution de mannite à 15 %; pH du mélange : 9,2.
- ◐ 3 g de sol + 10 cm³ de la même solution-tampon-phosphate-arséniate-borate; puis on ajoute 5 cm³ d'eau; pH du mélange : 9,6.

Des équations exprimant l'inhibition compétitives ou non, d'une réaction enzymatique (78), il résulte que, pour une même concentration en substrat, le rapport de la vitesse de la réaction en l'absence d'inhibiteur à la vitesse de la réaction en présence d'inhibiteur, répond à la relation $V/Vi = 1 + K [I]$, où [I] est la concentration de l'inhibiteur. Or les productions d'ammonium obtenues à divers pH et concentrations en borate ne sont pas en accord avec cette équation; les points correspondant aux différentes concentrations de l'inhibiteur ne se situent pas sur une droite, mais sur une courbe qui s'infléchit vers l'axe des abscisses (fig. XIV). L'augmentation progressive de la concentration de l'inhibiteur amène donc une augmentation de plus en plus faible du rapport V/Vi; la vitesse de la réaction en présence de borate semble ainsi tendre vers une valeur limite, laquelle pourrait correspondre à l'activité d'une asparaginase sur laquelle le borate n'aurait aucun effet. La mesure effectuée en l'absence de borate correspondrait alors à la somme des activités de l'asparaginase inhibée par le borate (asparaginase A) et de celle qui n'est pas affectée par ce corps (asparaginase B). D'après A. Roush et E. Norris (95), l'inhibition de la xanthine-oxydase par le borate résulterait de la formation d'un complexe entre le borate et des radicaux oxydriles de la molécule de l'enzyme; cet effet est, comme dans le cas de l'asparaginase du sol, supprimé par l'addition d'un sucre. L'influence du borate sur l'asparaginase A pourrait également traduire la présence dans la molécule de cette enzyme, de radicaux oxydriles qui seraient absents de la molécule de l'asparaginase B.

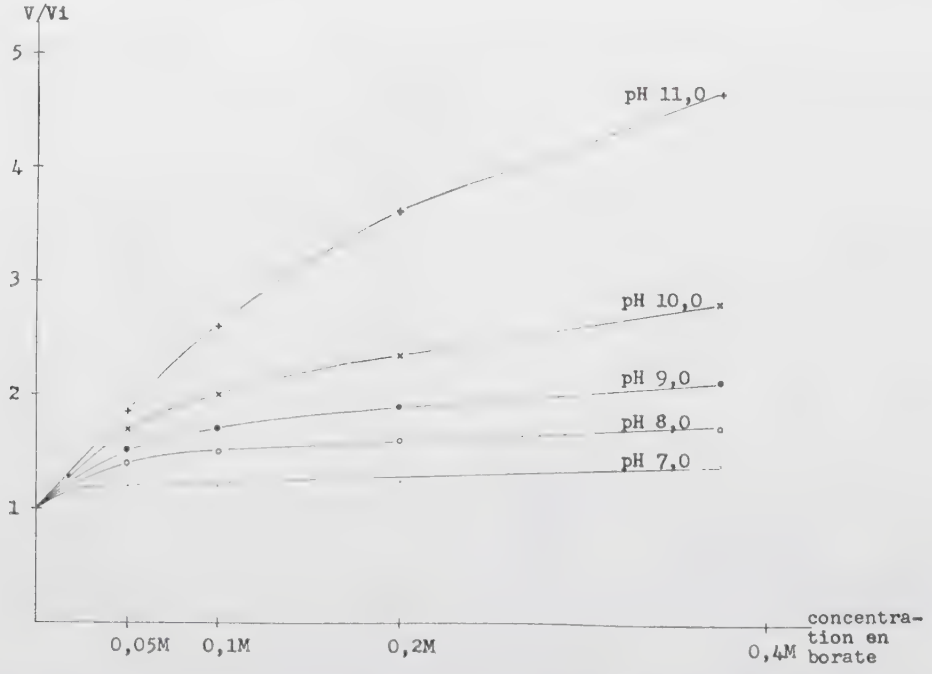


Fig. XIV. — INHIBITION DE L'ASPARAGINASE DU SOL FP PAR LE BORATE
V/Vi : Rapport entre les productions d'ammonium obtenues, d'une part, en l'absence de borate et, d'autre part, en présence de borate à différentes concentrations. Les mesures ont été effectuées graphiquement à partir des courbes de la figure XII.

Les résultats rapportés à la figure XIV montrent que l'effet inhibiteur du borate est faible à pH 7,0 puis s'amplifie lorsque le pH s'élève au-dessus de cette valeur; l'asparaginase A occupe donc une place de plus en plus importante dans la production totale d'ammonium par les deux enzymes, lorsque le pH croît. Les différences entre les productions d'ammonium obtenues, d'une part, en présence de tampon-phosphate et, d'autre part, en présence de tampon-phosphate-borate pour divers

sols (fig. XV), ont été évaluées graphiquement et rapportées à la figure XI. Elles augmentent avec le pH et n'ont pas encore, généralement, atteint un optimum vers pH 11,0. Ceci est gênant pour l'évaluation de l'activité de l'asparaginase A, la rétrogradation de l'ammonium étant élevée en milieu basique. Seule a été retenue pour l'étude de l'activité enzymatique du sol, l'asparaginase B. Toutefois le comportement comparatif des asparaginases A et B, lors de divers traitements du sol, sera examiné ultérieurement dans le but de mieux différencier les deux enzymes.

La courbe représentant l'activité de l'asparaginase du sol FP en fonction de la durée de la réaction, dans le milieu contenant un tamponp-hosphate (fig. XVI) est tout à fait analogue à celle qui a été obtenue en présence de borate (fig. VII). Le fait qu'il n'y ait pas d'augmentation de la vitesse de la réaction au cours du séjour à 49° montre que n'intervient pas, tout au moins avec une intensité

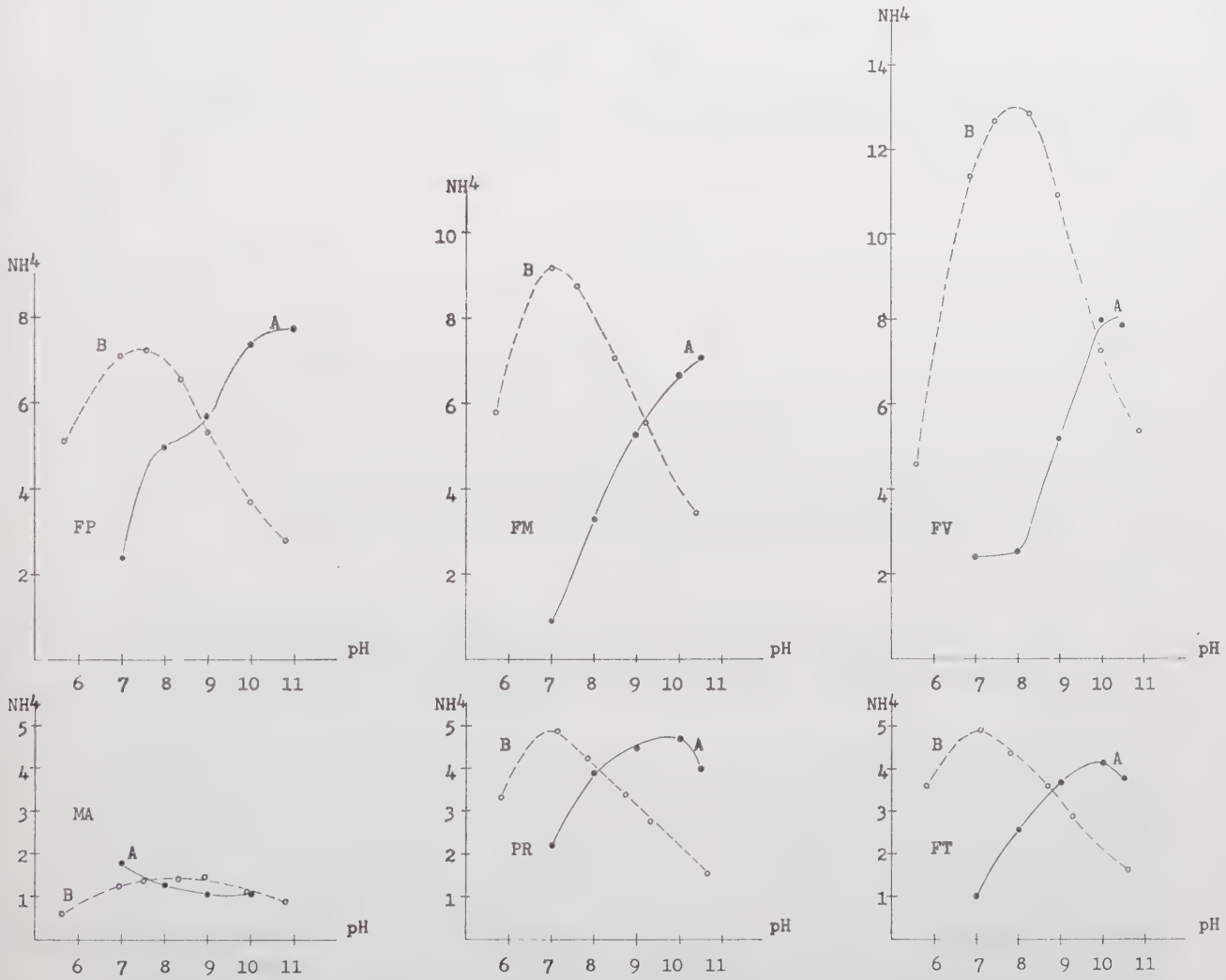


Fig. XV. — INFLUENCE COMPARÉE DU pH SUR L'ACTIVITÉ DES ASPARAGINASES A ET B

Les mesures ont été effectuées graphiquement à partir des courbes représentées à la figure XI; elles sont exprimées en cm^3 d'ammonium N/25.

A) Différence entre les productions d'ammonium obtenues, d'une part, en l'absence de borate (tampon P1 à P7) et, d'autre part, en présence de borate (tampon PB1 à PB7).

B) Activité de l'asparaginase mesurée en présence de borate (tampon PB1 à PB7).

appréciable, l'activité de microorganismes décelée, d'une part, lors de la mesure des témoins et, d'autre part, dans l'expérience relative à la réversibilité de l'action du bore. Les conditions anaérobies de la mesure constituent vraisemblablement un obstacle à l'activité des microorganismes.

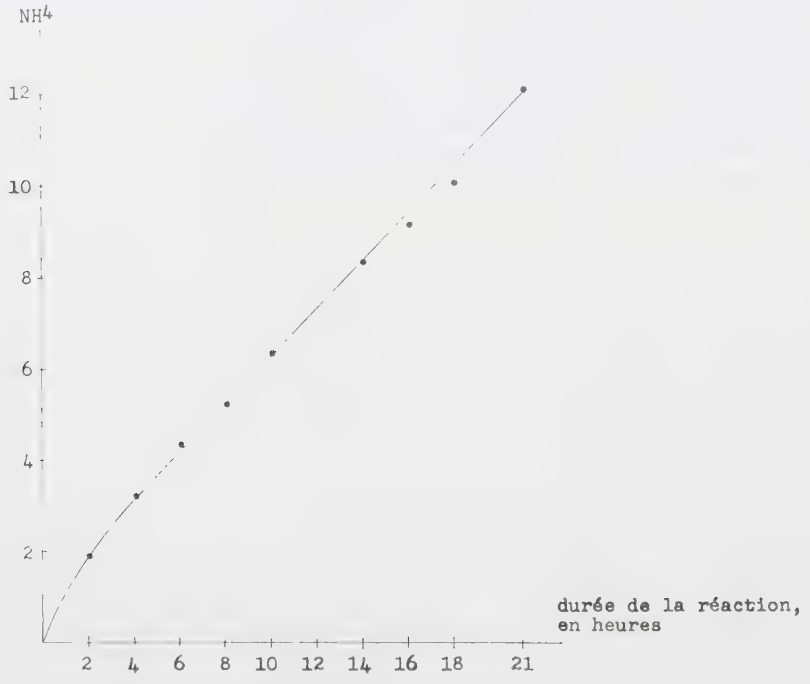


Fig. XVI. — INFLUENCE DE LA DURÉE DE LA RÉACTION SUR LA PRODUCTION D'AMMONIUM A 49°, EN PRÉSENCE DE TAMPON-PHOSPHATE

3 g de sol FP + 15 cm³ de solution-tampon-phosphate 0,2M contenant 1,66 % d'asparagine; pH du mélange : 9,0. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

III. — ÉTUDE DE FACTEURS SUSCEPTIBLES DE PROVOQUER UNE AUGMENTATION D'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE DANS LES SOLS

D'après certains auteurs (43), (14), (28), une production d'enzyme peut avoir lieu lors de la mesure de l'activité enzymatique des sols. Cette production pourrait être due à une multiplication de microorganismes; mais elle pourrait aussi résulter de l'activité de cellules non proliférantes dans lesquelles la synthèse de l'enzyme serait induite par le substrat (100), (85), (13). Cependant il devrait être alors possible de mettre en évidence un accroissement de la vitesse de la réaction au cours de la mesure enzymatique. S'il en était ainsi, les mesures ne traduiraient pas la teneur du sol en enzymes dans les conditions naturelles ou tout au moins dans les conditions où se trouve le sol préalablement, à la mesure. J. P. CONRAD (21), (22) a observé une augmentation de la vitesse d'hydrolyse de l'urée dans les sols en présence de toluène, 12 ou 24 heures après le début de la réaction. L'auteur a montré qu'il ne se produisait pas de multiplication de microorganismes; il attribue l'augmentation d'activité, soit à une libération d'uréase par les cellules, soit à une modification de l'activité de l'enzyme adsorbée. Il est cependant possible qu'elle résulte d'une production d'uréase par des cellules non proliférantes.

Lors de la mesure de l'activité de l'asparaginase des sols on n'observe pas d'augmentation de la vitesse de la réaction; mais au contraire, une diminution d'activité se produit au cours des premières heures. Il ne semble donc pas qu'une synthèse d'asparaginase ait lieu dans ces conditions. Par contre, les perturbations observées lors de l'évaluation des témoins en l'absence de borate, pourraient être dues à l'activité de microorganismes; en outre il semble qu'une production d'asparaginase se soit manifestée en l'absence de borate et lorsque le borate était masqué par la mannite, dans l'expérience rapportée à la figure XIII. Dans le but d'éliminer le risque d'une production d'asparaginase au cours de la mesure de son activité dans les sols, les conditions susceptibles de permettre une synthèse de l'enzyme et les facteurs d'inhibition de la synthèse ont été recherchés.

Augmentation de l'activité enzymatique en présence de nitrate.

En l'absence de borate, le nitrate provoque une augmentation de l'activité de l'asparaginase du sol γFP (fig. XVII). L'activité de l'asparaginase croît avec la concentration en nitrate jusqu'à la valeur M/15. Au-delà, l'augmentation d'activité devient de moins en moins importante, puis vers la concen-

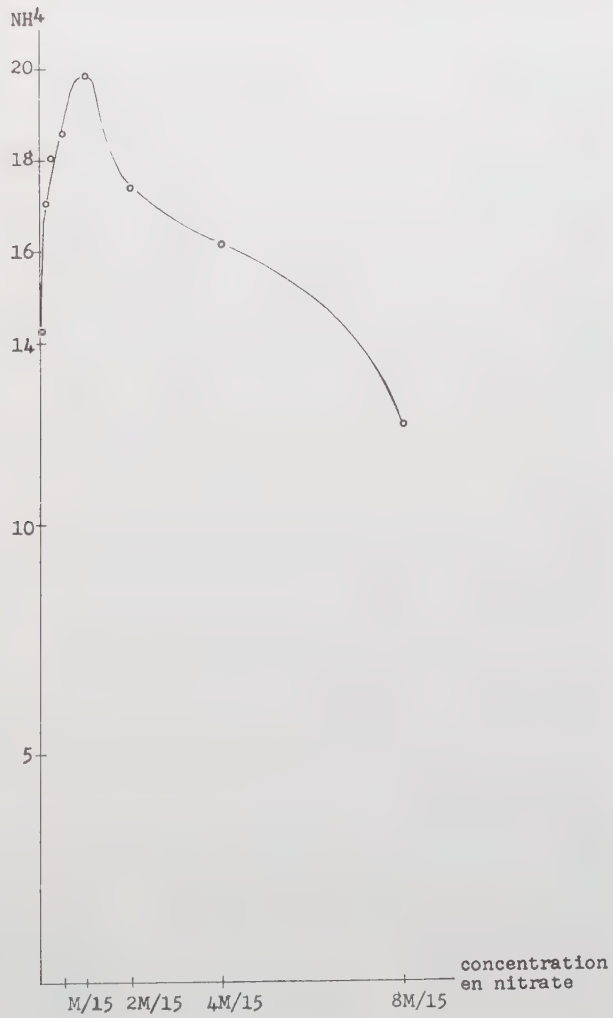


Fig. XVII. — INFLUENCE DU NITRATE SUR L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DU SOL

5 g de sol γFP + 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon-phosphate (0,4M) (pH du mélange : 7,4), du fluorure à la concentration M/3, du nitrate à différentes concentrations et de l'asparagine à la concentration 1,66 %. 21 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

tration 8M/15 en nitrate, il se produit une diminution de l'activité. Cette allure de la courbe d'activité de l'asparaginase en fonction de la concentration en nitrate, traduit une double influence de ce corps. Aux faibles concentrations, un effet favorable se manifeste, par contre une influence défavorable prédomine aux concentrations élevées.

L'augmentation de l'activité enzymatique, en présence de nitrate à la concentration M/15, correspond à un accroissement de la vitesse de la réaction entre les 10e et 14e heures de la réaction (fig. XVIII). La portion de la courbe d'activité précédant cet accroissement de la vitesse ne traduit aucune influence du nitrate, en effet la prolongation de la phase rectiligne initiale passe par le point représentant la production d'ammonium ayant lieu en 21 heures en l'absence de nitrate. Au-delà de 14 heures la vitesse de la réaction est constante. La phase d'augmentation de la vitesse s'étale donc au maximum sur 4 heures. Elle correspond vraisemblablement à une synthèse d'asparaginase dans laquelle le nitrate aurait le rôle d'accepteur d'hydrogène. En l'absence de nitrate la synthèse de l'asparaginase serait vraisemblablement empêchée par les conditions anaérobies de la mesure. Cette interprétation permet d'expliquer l'augmentation d'activité observée après aération consécutive à une

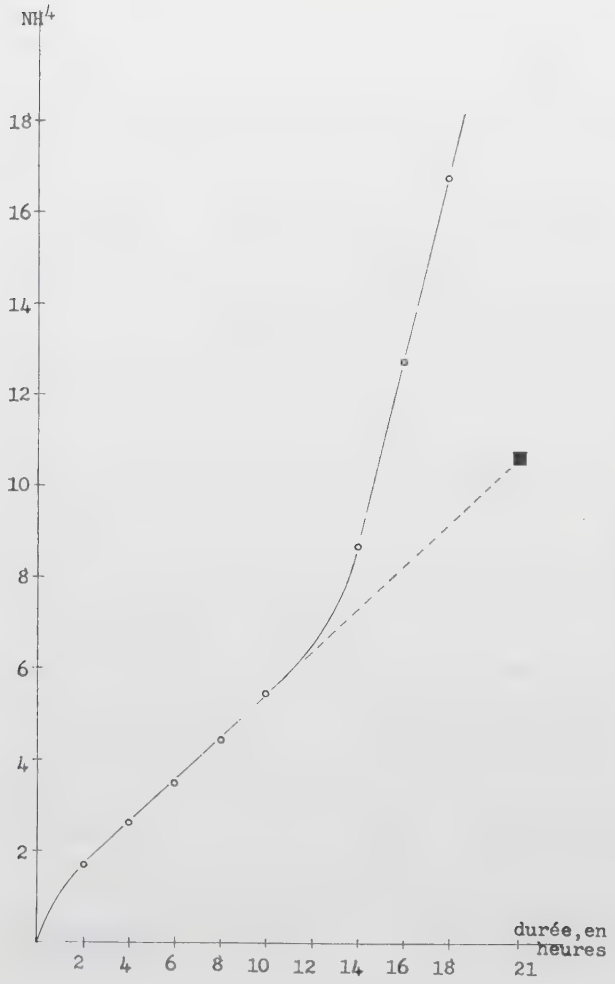


Fig. XVIII. — ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE DU SOL EN FONCTION DE LA DURÉE DE LA RÉACTION, EN PRÉSENCE DE NITRATE

3 g de sol FP + 15 cm³ de solution-tampon-phosphate (0,2M) (pH de la suspension : 7,9), contenant 1,66 % d'asparagine et du nitrate de potassium à la concentration M/15. Température : 49°. Durée de la réaction : variable. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

■ Témoin sans nitrate.

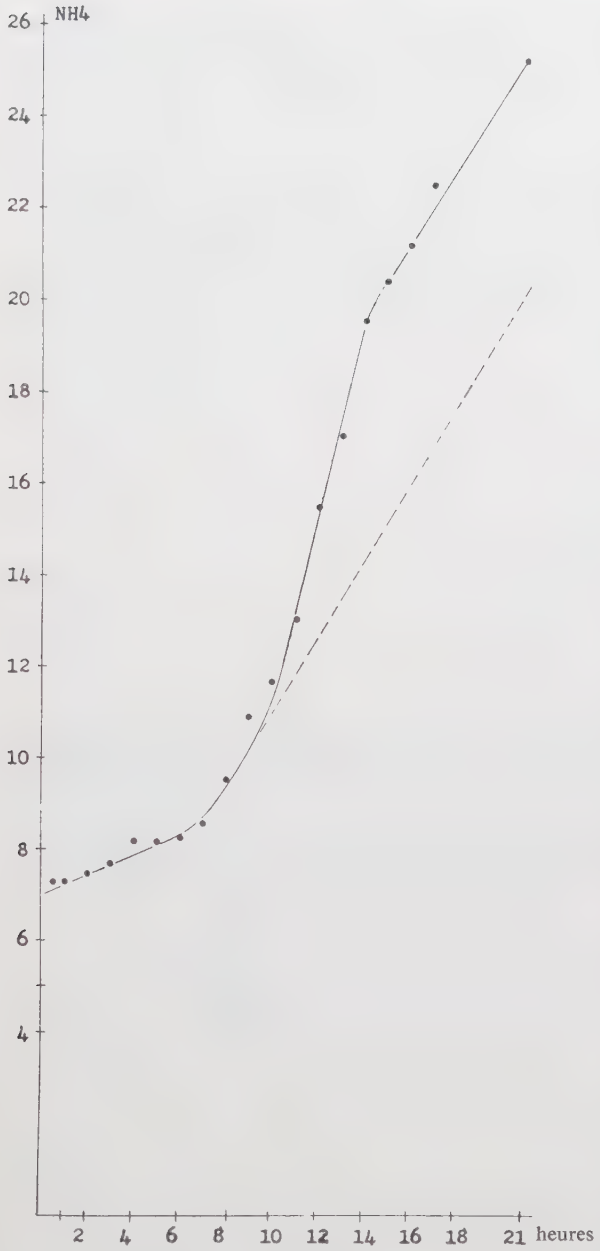


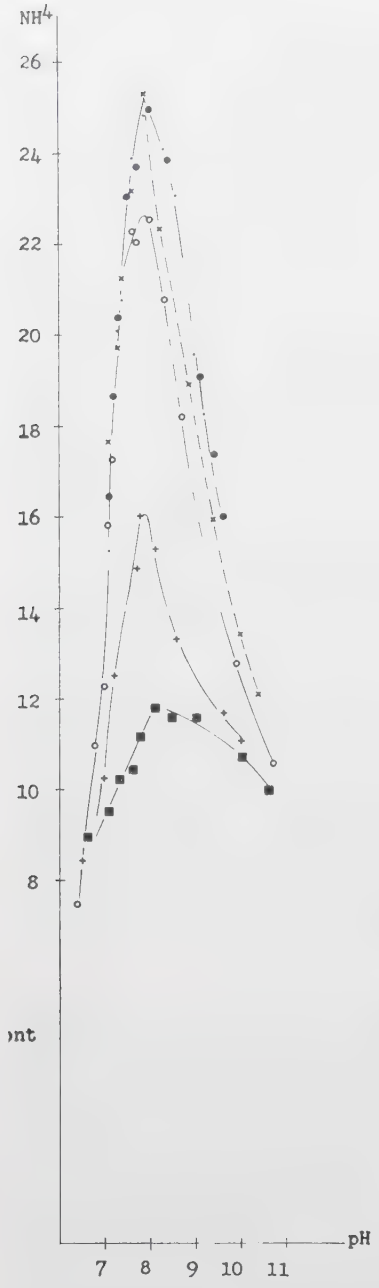
Fig. XIX. — INFLUENCE DU NITRATE SUR L'ACTIVITÉ DES ASPARAGINASES A ET B

3 g de sol FP sont mélangés avec 10 cm³ de solution-tampon-phosphate (0,2M) (pH du mélange 7,9), contenant du nitrate de potassium à la concentration M/15 et 1,66 % d'asparagine. Après une durée de séjour variable à 49°, on ajoute au mélange, 5 cm³ de solution-phosphate (0,2M)-borate (0,6M), contenant du nitrate de potassium à la concentration M/15 et 1,66 % d'asparagine. Le pH est peu modifié (valeur 7,6). La réaction est poursuivie jusqu'à ce que la durée totale du séjour à 49°, soit de 21 heures. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

brève agitation des tubes dans l'expérience rapportée à la figure XIII.

L'accroissement de la vitesse de la réaction en présence de nitrate a d'autre part été suivi en ajoutant du borate à différentes étapes de la réaction (fig. XIX). Trois phases se présentent. La première est analogue à la droite ascendante de la figure XIII/A; elle correspond à l'activité de l'asparaginase A initiale en fonction de la durée de la réaction, la production d'ammonium étant déterminée à partir du point de rencontre de la droite avec l'axe des ordonnées. La troisième phase correspond à l'activité de l'asparaginase A initiale augmentée de l'activité de l'asparaginase A synthétisée. Dans le cas où il y aurait uniquement synthèse d'asparaginase A, cette phase occuperait une position inférieure représentée par la droite tracée en pointillés sur la figure. Il en résulte qu'il y a également synthèse d'asparaginase B. La phase intermédiaire correspondant à la synthèse des asparaginases, se déroule entre les 8e et 14e heures de la réaction; elle prend fin au même moment que dans l'expérience précédente, mais commence plus tôt. Ceci montre que dans une partie des cellules au moins, les étapes de la synthèse sur lesquelles intervient le borate, étaient franchies 8 heures après le début de la réaction. La synthèse a pu également être hatée par l'aération du milieu due à l'agitation des tubes après addition de la solution borique.

La différence entre les pentes des droites représentant les première et troisième phases de la réaction (fig. XIX) permet d'évaluer l'activité de l'asparaginase A synthétisée; elle est égale à trois fois environ l'activité de l'asparaginase A initiale, mesurée dans les mêmes conditions de pH. D'autre part, la différence entre les pentes des deux droites de la figure XVIII permet d'évaluer la somme des activités des asparaginases A et B synthétisées; elle est égale à trois fois environ la somme des activités des asparaginases A et B initiales. Il en résulte que l'activité de l'asparaginase B synthétisée est elle-même égale à trois fois l'activité de l'asparaginase B initiale. La synthèse des asparaginases A et B n'affecte donc pas le rapport des activités de ces deux enzymes dans le sol.



Influence du pH et de divers éléments minéraux sur l'augmentation d'activité enzymatique due au nitrate.

Le pH optimum de la synthèse est de 7,9 (fig. XX). Au-dessous de cette valeur, la production d'asparaginase diminue rapidement; elle est faible à pH 7,0. Au-dessus du pH optimum la production d'asparaginase diminue moins brutalement; elle a lieu jusqu'aux environs de pH 10,0.

Fig. XX. — INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN PHOSPHATE, SUR L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE EN PRÉSENCE DE NITRATE

3 g de sol FP + 15 cm³ de solution-tampon-phosphate, de concentration variable, contenant du nitrate de potassium à la concentration M/15 et de l'asparagine à la concentration 1,66 %. 21 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

Concentration en phosphate : • 0,1M ● 0,133M × 0,2M ○ 0,266M + 0,532M ■ 0,8M

La synthèse de l'enzyme est sensiblement la même aux concentrations 0,1M et 0,2M en phosphate (fig. XX), puis elle diminue progressivement lorsque la concentration augmente; elle est à peu près nulle en présence de phosphate à la concentration 0,8M. Le fluorure a un effet à peine plus important que le phosphate (fig. XXI); la suppression presque totale de la synthèse nécessite une concentration de 0,8M en fluorure. L'arséniate est plus actif; à la concentration 0,2M il ne permet qu'une synthèse très réduite. Le borate est beaucoup plus énergique que les corps précédents; la synthèse n'a plus lieu en présence de borate à la concentration 0,1M.

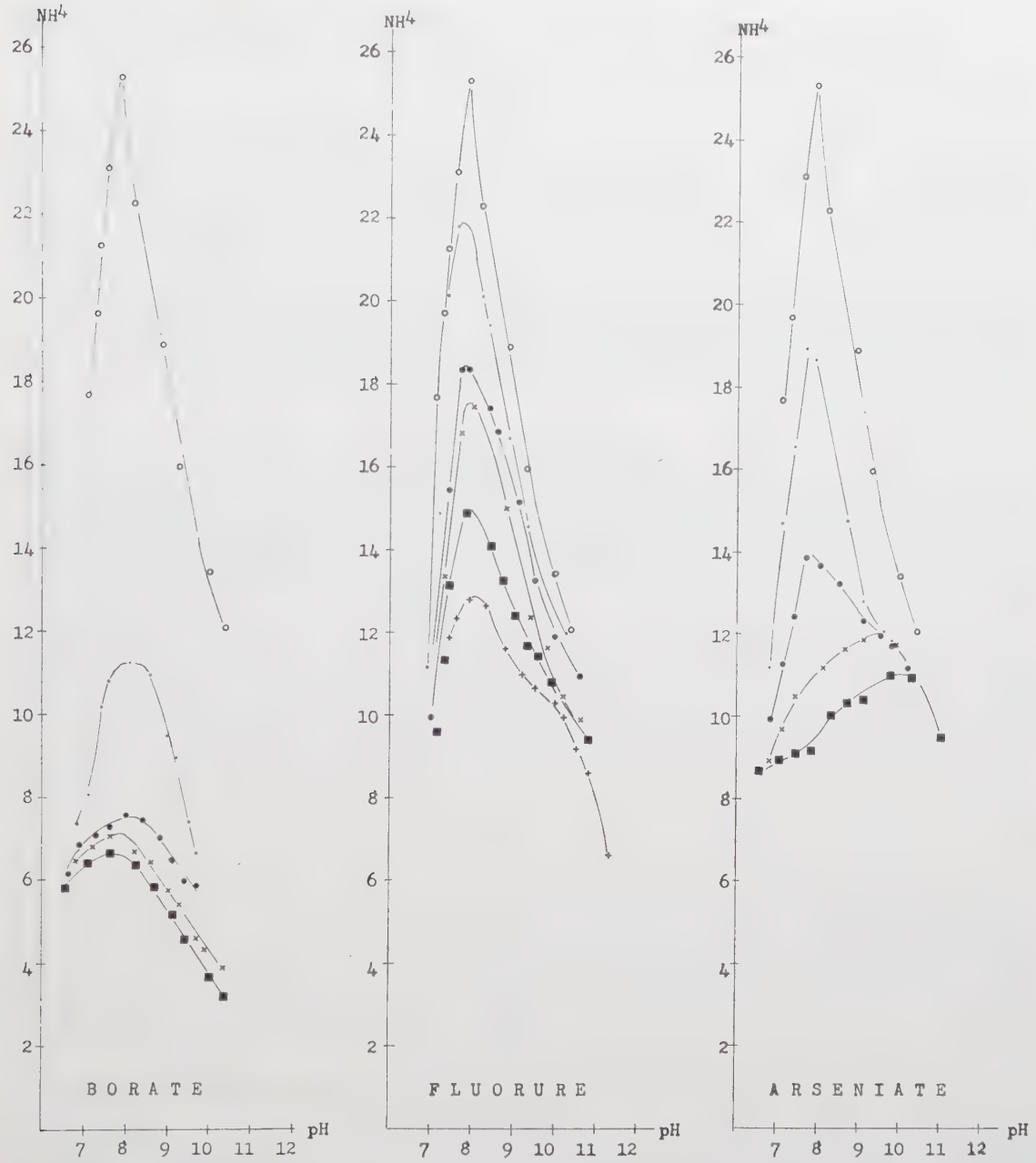


Fig. XXI. — INFLUENCE DU BORATE, DU FLUORURE ET DE L'ARSÉNIATE, SUR L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE EN PRÉSENCE DE NITRATE

3 g de sol FP + 15 cm³ de solution-tampon-phosphate (0,2 M), contenant du borate, du fluorure ou de l'arséniate à différentes concentrations, du nitrate de potassium à la concentration M/15 et de l'asparagine à la concentration 1,66 %. 21 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

concentration en borate, fluorure ou arséniate : ○ 0 ; • 0,05 M ; ● 0,1 M ; × 0,2 M ; ■ 0,4 M ; + 0,8 M

Ces résultats montrent que, dans les conditions retenues pour la mesure de l'activité de l'asparaginase des sols, la synthèse de l'enzyme ne peut avoir lieu, le borate étant présent dans le milieu à une concentration bien supérieure à celle qui inhibe la synthèse.

En ce qui concerne les mesures effectuées en l'absence de borate, lors de la mise en évidence de l'asparaginase A, nous avons observé, pour la majorité des sols, que l'arséniate n'affecte pas l'activité enzymatique (fig. XI). Or ce corps a un effet dépressif très marqué sur la synthèse, à la concentration utilisée dans le milieu. Il ne se produit donc pas de synthèse d'asparaginase dans ces sols, lorsqu'ils sont placés dans la solution-tampon-phosphate, vraisemblablement à cause des conditions anaérobies de la mesure. Ceci est confirmé par l'allure rectiligne de la deuxième partie de la courbe représentant l'activité de l'asparaginase en fonction de la durée de la réaction, dans la solution-tampon-phosphate (fig. XVI). Cependant, lors de la mesure de l'activité de l'asparaginase dans la solution-tampon-phosphate, une production d'enzyme est possible dans le cas de sols riches en nitrate; pour éliminer ce risque il est donc nécessaire d'ajouter au milieu de l'arséniate à une concentration au moins égale à 0,4M.

La production d'asparaginase ayant lieu en présence de nitrate pourrait être due à l'activité des cellules non proliférantes. En effet, la solution surnageant au-dessus de la terre, à l'issue de la réaction, est limpide. On observe cependant un léger voile en surface; mais celui-ci est également présent sur les solutions ne renfermant pas de nitrate, dans lesquelles la synthèse n'a pas lieu. La formation du voile n'est donc pas en relation avec la production d'asparaginase.

deuxième partie

LOCALISATION DE L'ASPARAGINASE DANS LES SOLS

Nous avons rapporté les considérations qui ont amené l'hypothèse d'une accumulation d'enzymes dans les sols: ce sont, d'une part, l'aptitude des sols à retenir les enzymes et, d'autre part, l'inertie plus ou moins marquée de l'activité enzymatique par opposition aux fluctuations de l'activité des microorganismes. Deux essais positifs d'élution concernant une fraction non précisée d'enzymes du sol ont par ailleurs été signalés. Cet aspect de l'étude des enzymes du sol est particulièrement important pour la signification des mesures, laquelle est évidemment fonction de la situation des enzymes dans le sol. Nous l'avons abordé ici de deux manières. D'une part en comparant l'enzyme naturellement présente dans les sols et l'asparaginase de levure adsorbée expérimentalement dans ces sols, quant à leur aptitude à être éluées. D'autre part nous avons tenté d'obtenir des critères de la localisation de l'enzyme en recherchant l'influence de divers facteurs sur l'activité de l'asparaginase du sol, puis nous avons étudié comparativement le comportement de l'asparaginase présente dans les cellules de levure.

IV. — ÉLUTION DE L'ASPARAGINASE DANS LES SOLS

Les premiers résultats de cette étude ont été rapportés antérieurement (84). Il parait cependant nécessaire d'apporter des précisions sur l'obtention de l'asparaginase de levure; le mode d'élution de l'enzyme dans les sols découle en effet de la technique de purification. Une étude complémentaire du déplacement de l'asparaginase adsorbée expérimentalement dans les sols est également rapportée ici; elle a permis d'augmenter la proportion d'enzyme éluée.

Préparation des solutions d'asparaginase de levure.

W. Grassmann et O. Mayr (42) libèrent l'asparaginase des cellules de levure par liquéfaction de la levure fraîche pressée, par action du toluène, puis neutralisation de la suspension par l'ammoniaque, lavage des cellules par centrifugation et ensuite repos de deux jours à pH 8,0 environ des cellules remises en suspension dans l'eau. La solution d'asparaginase est séparée par centrifugation.

Nous avons employé une technique très voisine de celle-ci. Les extraits sont préparés chaque fois à partir de 2 kg de levure fraîche de boulangerie réduite en petits fragments, auxquels sont ajoutés 250 cm^3 de toluène. Une fois sortie du réfrigérateur, cette masse de levure se réchauffe trop lentement pour permettre une action suffisamment rapide du toluène; il est nécessaire d'amener préalablement la levure à 25° par un séjour d'une nuit à l'étuve. La température influe également sur les étapes suivantes de la préparation; ainsi à 30° le passage de l'enzyme en solution est plus rapide qu'à 7°.

Pour pouvoir fixer la durée de ces étapes successives dans le protocole d'extraction, il est donc nécessaire d'opérer à température connue; celle-ci ne doit cependant pas être trop élevée afin d'éviter une destruction de l'asparaginase, destruction qui est déjà importante à 30°. Ainsi, les extraits obtenus en 24 heures à cette température renferment moins d'enzyme que les extraits obtenus à 25°; de plus on observe le jour suivant une diminution de la teneur en enzyme à 30° alors que celle-ci augmente encore légèrement à 25°. Cette dernière température a été retenue pour l'ensemble des opérations de préparation des extraits de levure.

Quatre heures après addition de toluène, la levure est mise en suspension dans 1,2 litres d'eau. Le pH de la suspension est amené à la valeur 8,5 par addition d'ammoniaque à la concentration 1,5N environ. Il évolue ensuite vers la neutralité pendant une ou deux heures ce qui nécessite de nouvelles additions d'ammoniaque; la quantité totale ajoutée est de 300 à 400 cm³. Deux heures après l'addition d'eau, les cellules sont centrifugées puis remises en suspension dans 2 litres d'eau; le pH est éventuellement ramené à la valeur 8,5 et la suspension est abandonnée à 25° pendant 2 jours au cours desquels e pH s'abaisse jusqu'à la valeur 8,0. L'extrait est séparé des cellules par centrifugation puis conservé dans un réfrigérateur.

La séparation des cellules est d'autant plus aisée que la concentration saline est plus faible; la première centrifugation, effectuée après les additions d'ammoniaque, a pour but de réduire la concentration saline. Dans la technique préconisée par W. GRASSMANN et O. MAYR, l'eau et l'ammoniaque ne sont ajoutées qu'après liquéfaction de la masse de levure. Il n'est cependant pas nécessaire que la liquéfaction ait lieu; il suffit d'ajouter l'eau un certain temps après l'addition de toluène. Mais le délai séparant les deux opérations ne doit pas être trop bref sinon la période pendant laquelle le pH évolue vers la neutralité serait prolongée et la quantité d'ammoniaque nécessaire pour amener le pH à la valeur 8,5 serait accrue; la séparation ultérieure des cellules par centrifugation serait alors génée.

La solution d'asparaginase ne peut être utilisée directement pour l'étude de l'élution de l'enzyme dans les sols; elle doit être purifiée. Il se produit en effet, en milieu acide, une floculation qui entraîne une partie de l'asparaginase et par suite peut interférer avec son adsorption dans les sols acides. L'entraînement est d'autant plus important que le pH est plus bas et la concentration saline plus élevée. La purification n'a pas été réalisée par adsorption vers pH 5,3 sur kaolin, puis élution vers pH 8,0, suivant la méthode employée par W. GRASSMANN et O. MAYR, laquelle ne permet pas d'éliminer la floculation ayant lieu en milieu acide. Nous avons procédé à l'adsorption sur kaolin en milieu basique en présence d'une concentration élevée en sulfate d'ammonique; l'élution est alors obtenue simplement par abaissement de la concentration saline.

A 100 cm³ d'extrait brut, sont ajoutés 25 cm³ de solution de sulfate d'ammonium 4M; le pH du mélange est amené à la valeur 9,0 par addition d'ammoniaque 1,5N, puis on élimine par centrifugation les substances qui ont floculé. Le surnageant est mélangé avec 2,5 g de kaolin délayés dans un peu d'eau; la suspension est brassée avec une baguette de verre pendant 15 à 20 minutes puis centrifugée. Le culot de kaolin retient l'asparaginase; il est repris à 15 minutes d'intervalle par quatre portions successives de 12,5 cm³ d'une solution de sulfate d'ammonium 0,1M et d'acide borique 0,08M amenée à pH 9,0 avec de l'ammoniaque. Cette opération permet d'éliminer les substances qui floculent en milieu acide et ont été en partie retenues par le kaolin. La solution est ajoutée progressivement dans le but de limiter l'élution de l'asparaginase au cours du lavage. 15 minutes après la dernière addition de solution de lavage, le kaolin est séparé par centrifugation puis mis en suspension dans 30 cm³ d'eau. L'asparaginase passe alors en solution. Après une heure environ on procède à l'élimination du kaolin par une double filtration sous vide sur un même filtre. La solution d'asparaginase purifiée est conservée dans un réfrigérateur. Son activité diminue plus rapidement que celle de l'extrait brut, elle est employée dans les 24 heures qui suivent sa préparation.

Les résultats des essais de purification rapportés ci-après, sont exprimés en cm³ d'ammonium N/25 produits à 49° dans le mélange constitué par 2 cm³ de solution d'asparaginase, 5 cm³ d'eau et

10 cm³ de solution-tampon PB3 contenant 2% d'asparagine. Ces mélanges sont effectués dès l'obtention des différentes solutions d'enzyme dans le but d'éviter une destruction de l'asparaginase en l'absence du substrat, pendant le déroulement de l'expérience. Deux séries sont réalisées simultanément; l'une est placée dans le compartiment à glace d'un réfrigérateur, c'est la série témoin, l'autre est immergée simultanément dans le bain-marie à 49°. Les résultats rapportés correspondent à la différence entre les productions d'ammonium obtenues dans les deux séries. Dans l'étude de l'élution de l'enzyme dans les sols, les témoins ont été réalisés également de cette façon, ce qui permet de déduire de la mesure, la production d'ammonium ayant lieu à la température ambiante pendant un temps plus ou moins long suivant la phase de l'expérience à laquelle correspond la mesure.

La quantité d'enzyme adsorbée sur le kaolin dans l'extrait brut est accrue par l'élévation de la concentration en sulfate d'ammonium, comme l'indiquent les résultats rapportés aux tableaux 23 et 24. Ces résultats obtenus les uns à pH 9,0 et les autres à pH 7,5 à partir d'un même extrait, montrent que l'élévation du pH a permis d'augmenter la proportion d'asparaginase fixée par le kaolin. L'activité de l'asparaginase de l'extrait brut n'est pas la même dans les deux essais; cela résulte, d'une part, de l'inégale durée de la réaction dans les deux cas et, d'autre part, de la destruction d'une fraction de l'enzyme dans l'extrait, au réfrigérateur, pendant le délai de six jours qui sépare ces deux essais. Un troisième facteur intervient sur l'adsorption de l'enzyme dans l'extrait brut, c'est la quantité de kaolin utilisé (tableaux 24 et 25). La proportion d'enzyme perdue lors du lavage du kaolin à pH 9,0 diminue lorsque la concentration saline de la solution de lavage et la quantité de kaolin augmentent (tableau 25). Elle est faible pour une concentration de 0,1M en sulfate d'ammonium, en présence de 2,5 g de kaolin. Dans l'essai de purification effectué à pH 7,5, rapporté au tableau 24, on observe

Volume de solution de sulfate d'ammonium 4M mélangée avec l'extrait brut.		10 cm³	15 cm³	20 cm³	25 cm³
Activité mesurée dans l'extrait brut		14,55	14,55	14,55	14,55
Surnageant après centrifugation du kaolin (enzyme non adsorbée)	Activité mesurée	6,27	2,31	—	2,03
	Activité rapportée à l'extrait brut	47,2 %	17,4 %	—	15,5 %
Solution de lavage	Activité mesurée	2,59	1,01	0,82	0,99
	Activité rapportée à l'extrait brut	8,9 %	3,5 %	2,8 %	3,4 %
Solution d'asparaginase purifiée.	Activité mesurée dans la 1re solution	19,63	24,96	28,06	28,83
	Activité mesurée dans la 2e solution	2,39	1,89	3,44	3,50
	Activité rapportée à l'extrait brut	37,9 %	46,2 %	54,2 %	55,2 %

Tableau 23. — *Purification de l'asparaginase de levure à* pH 9,0. *Influence de la concentration saline dans l'extrait brut.* 100 cm³ d'extrait + 10 cm³ de solution-tampon-acide borique-ammoniaque (0,8 M) + différentes quantités de sulfate d'ammonium + 2 g de kaolin. Les opérations sont ensuite conduites suivant la technique décrite. Toutefois l'enzyme est éluée dans 25 cm³ d'eau au lieu de 30 cm³ et une élution complémentaire est effectuée par filtration à travers le kaolin d'un deuxième volume d'eau de 25 cm³. La durée de la réaction est de 4 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

Quantité de kaolin ajoutée à l'extrait brut		2,5 g	2,5 g	5,0 g	5,0 g
Volume de solution de sulfate d'ammonium 4M mélangée avec l'extrait brut		15 cm³	20 cm³	15 cm³	20 cm³
Activité mesurée dans l'extrait brut		18,40	18,40	18,40	18,40
Surnageant après centrifugation du kaolin (enzyme non adsorbée)	Activité mesurée	9,88	7,33	8,48	5,17
	Activité rapportée à l'extrait brut	59,1 %	43,8 %	50,7 %	30,9 %
Solution de lavage.	Activité mesurée	1,81	1,85	3,19	2,09
	Activité rapportée à l'extrait brut	4,9 %	5,0 %	8,9 %	5,7 %
Solution d'asparaginase purifiée.	Activité mesurée	6,12	8,30	11,07	13,23
	Activité rapportée à l'extrait brut	16,6 %	22,5 %	31,8 %	36,0 %

Tableau 24. — *Purification de l'asparaginase de levure à* pH 7,5. *Influence de la quantité de kaolin et de la concentration saline dans l'extrait brut.* 100 cm³ d'extrait + 10 cm³ de solution-tampon-acide borique-ammoniaque (0,8 M) + différentes quantités de sulfate d'ammonium et de kaolin. Après adsorption de l'enzyme, le kaolin est lavé en une seule fois par 50 cm³ de solution de sulfate d'ammonium (0,2 M) et d'acide borique (0,08 M) amenée à pH 8,0 par de l'ammoniaque. L'élution est effectuée par 50 cm³ d'eau. La durée de la réaction est de 5 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

Quantité de kaolin ajoutée à l'extrait brut	Extrait brut	Surnageant après centrifugation du kaolin (enzyme non adsorbée)		Solution de lavage L1 ou L2		Solution d'asparaginase purifiée		
		Activité mesurée	Activité rapportée à l'extrait brut	Activité mesurée	Activité rapportée à l'extrait brut	Activité mesurée dans la première solution	Activité mesurée dans la deuxième solution	Activité rapportée à l'extrait brut
g			%		%			%
0,625	12,0	3,46	31,6	L1 : 12,14	31,5	3,06	0,16	8,3
«	«	«	«	L2 : 6,33	16,5	11,50	0,17	30,4
1,250	«	2,06	18,9	L1 : 5,81	15,1	11,45	0,46	31,0
«	«	«	«	L2 : 1,27	3,3	16,81	1,36	47,1
2,500	«	1,00	9,1	L1 : 2,73	7,0	17,64	1,22	49,2
«	«	«	«	L2 : 0,78	2,0	19,98	1,40	54,7
3,750	«	0,97	8,9	L1 : 1,31	3,4	19,96	1,69	54,8
«	«	«	«	L2 : 0,54	1,4	21,15	2,12	60,7
5,000	«	0,62	5,7	L1 : 0,85	2,2	19,85	2,91	59,3
«	«	«	«	L2 : 0,52	1,3	18,64	3,44	57,5

Tableau 25. — *Purification de l'asparaginase de levure à* pH 9,0; *influence de la quantité de kaolin et de la concentration saline de la solution de lavage.* 100 cm³ d'extrait + 25 cm³ de solution de sulfate d'ammonium 4 M + différentes quantités de kaolin. Après adsorption de l'enzyme, le kaolin est lavé en une seule fois par 31 cm³ de solution L1 ou L2 de pH 9,0, contenant chacune de l'acide borique à la concentration 0,08 M et du sulfate d'ammonium, respectivement à la concentration 0,06 M et 0,1 M. L'élution est effectuée par 31 cm³ d'eau. Une élution complémentaire est réalisée par filtration à travers le kaolin d'un deuxième volume d'eau de 31 cm³. La durée de la réaction est de 5 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

par contre une perte plus élevée avec 5 g de kaolin qu'avec 2,5 g. La quantité d'enzyme éluée n'est pas sensiblement augmentée par la filtration d'un deuxième volume d'eau à travers le kaolin (tableaux 23 et 25).

La technique de purification précédemment décrite permet d'obtenir, d'après les résultats rapportés au tableau 25, plus de 50 % de l'asparaginase présente dans l'extrait brut. Le comportement de l'enzyme n'est pas, cependant, identique dans tous les extraits; il est quelquefois nécessaire d'augmenter les quantités de sulfate d'ammonium et de kaolin pour permettre le passage d'une proportion importante de l'enzyme dans la solution d'asparaginase purifiée (tableau 26).

Quantité de kaolin ajoutée à l'extrait brut	Volume de solution de sulfate d'ammonium 4 M mélangé avec l'extrait brut	Activité des différents extraits bruts	Solution d'asparaginase purifiée	
			Activité mesurée	Activité rapportée à l'extrait brut
g				%
2,50	25 cm³	1° 17,30	24,41	44,3
«	«	2° 10,30	4,95	15,0
3,75	«	«	11,35	33,2
2,50	35 cm³	«	8,97	27,3
3,75	«	«	13,08	39,8
2,50	25 cm³	3° 12,56	13,41	33,4
3,75	«	«	16,16	40,2
2,50	35 cm³	«	16,95	42,2
3,75	«	«	18,57	46,3
3,60	«	4° 11,62	15,78	42,5

Tableau 26. — *Purification de l'asparaginase de divers extraits de levure à* pH 9,0.
100 cm³ d'extrait + différentes quantités de kaolin et de sulfate d'ammonium. Après adsorption de l'enzyme, le kaolin est lavé par quatre additions successives de 16 cm³ de solution de pH 9,0 contenant du sulfate d'ammonium et de l'acide borique respectivement à la concentration 0,1 M et 0,08 M. L'élution est effectuée par 31 cm³ d'eau. La durée de la réaction est de 5 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

Ces essais de purification montrent que l'enzyme adsorbée sur le kaolin, en milieu basique, en présence d'une concentration saline suffisante, peut être éluée par abaissement de la concentration saline. C'est cette propriété de l'asparaginase qui a été utilisée pour éluer l'enzyme dans les sols.

Recherche des conditions d'élution dans les sols. Comportement respectif de l'asparaginase de levure et de l'asparaginase du sol.

La solution d'asparaginase de levure est filtrée sous vide, à travers le sol placé sur entonnoir de Buchner; le filtrat est remis deux ou trois fois sur le sol afin que celui-ci s'humecte entièrement; le sol est ensuite essoré par action du vide. Pour tous les sols employés la totalité de l'asparaginase contenue dans les solutions utilisées était alors adsorbée. L'adsorption est réalisée sur deux échantillons du même sol dont l'un est soumis à la mesure de l'activité enzymatique et l'autre aux opérations d'élution. Deux témoins correspondants sont effectués simultanément dans les mêmes conditions avec une solution d'asparaginase dans laquelle l'enzyme a été détruite par la chaleur. Lors de la recherche des conditions optimales d'élution, les mesures de l'activité enzymatique ont été effectuées uniquement sur les solutions d'extraction provenant de sols enrichis en asparaginase de levure.

La nature du cation contenu dans la solution éluante n'a pas une grande influence sur l'élution de l'asparaginase, comme le montrent les résultats rapportés au tableau 27. Il est donc possible de remplacer par le sodium ou le potassium, l'ammonium qui donne des chiffres trop élevés à la distillation et avait été précédemment utilisé. La préparation des solutions éluantes a été effectuée à partir

Concentration de l'acide borique	Ion ammonium			Ion sodium			Ion potassium		
	Première élution par la solution borique	Deuxième élution par la solution d'asparagine	Activité totale éluée	Première élution par la solution borique	Deuxième élution par la solution d'asparagine	Activité totale éluée	Première élution par la solution borique	Deuxième élution par la solution d'asparagine	Activité totale éluée
0,08M	0,92	0,30	1,22	1,14	0,40	1,54	0,94	0,26	1,20
0,16M	1,12	0,37	1,49	1,47	0,39	1,88	0,88	0,30	1,18
0,26M	0,82	0,41	1,23	1,22	0,20	1,42	0,68	0,30	0,98
0,40M	0,57	0,41	0,98	0,88	0,22	1,08	0,53	0,28	0,81
0,80M	0,35	0,59	0,94	0,40	0,51	0,91	0,45	0,54	0,99

Tableau 27. — *Influence du cation présent dans la solution éluante, sur l'élution de l'asparaginase.* 12,5 g de sol αRI sont essorés après filtration de 25 cm³ de solution d'asparaginase purifiée. 25 cm³ de solution de pH 8,2, contenant de l'asparagine à la concentration 2 %, de l'acide borique à différentes concentrations et une base (soude, potasse ou ammoniaque), sont ensuite filtrés à travers le sol; puis 25 cm³ de solution d'asparagine à 2 % sont filtrés à travers le sol. 10 cm³ de filtrat sont mélangés avec 5 cm³ de solution-tampon 2PB3 contenant 2 % d'asparagine. La durée de la réaction est de 5 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

des solutions-tampon B1Na, B2Na et B3Na qui contiennent de la soude à la concentration 0,2N et de l'acide borique aux concentrations respectives de 0,8M, 0,4M et 0,26M; les pH de ces solutions sont les suivants: 8,2, 9,4 et 9,9. Quelques solutions éluantes ont été préparées à partir des solutions-tampon B1K, B2K et B3K qui renferment les mêmes concentrations d'acide borique et de base que les précédentes, mais dans lesquelles la soude est remplacée par de la potasse. Les mesures ont été effectuées en présence de tampon 2PB3 dont la composition est la même que celle du tampon PB3 mais dont la concentration est deux fois plus élevée.

1. Élution par mise en suspension du sol dans la solution éluante

Les résultats rapportés au tableau 28 traduisent un comportement de l'enzyme de levure dans le sol, analogue à celui qui a été observé avec le kaolin. En effet, l'élution de l'asparaginase fixée par le sol se produit également en milieu basique et pour un même pH elle est d'autant plus importante que

Désignation de la solution-tampon		Proportion de la solution-tampon dans la solution éluante				
		10 %	25 %	50 %	75 %	100 %
B1Na	pH de la suspension.....	7,9	8,0	8,1	8,1	8,1
	activité de l'asparaginase éluée....	3,96	4,76	1,36	0,65	0,39
B2Na	pH de la suspension.....	8,0	8,3	8,6	8,8	8,9
	activité de l'asparaginase éluée....	5,22	6,99	4,76	2,65	1,30
B3Na	pH de la suspension.....	8,0	8,4	8,7	8,9	9,05
	activité de l'asparaginase éluée....	4,88	7,75	5,37	3,15	1,56

Tableau 28. — *Influence du* pH *et de la concentration saline, dans la suspension de sol, sur l'élution de l'asparaginase.* 12,5 g de sol αJA sont essorés après filtration de 25 cm³ de solution d'asparaginase purifiée, puis mélangés avec 25 cm³ de solution éluante contenant de l'asparagine à la concentration 2 % et différentes proportions d'une solution-tampon borique: B1Na, B2Na ou B3Na. Après 1 heure de contact le pH de la suspension de sol est mesuré, puis la solution est séparée par filtration sur entonnoir de Buchner, 10 cm³ de filtrat sont mélangés avec 5 cm³ de solution-tampon 2PB3, contenant 2 % d'asparagine. La durée de la réaction est de 5 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

la concentration saline est plus faible. L'examen du tableau 29 montre que la quantité d'enzyme éluée après une heure de contact n'est pas beaucoup plus importante que celle qui est éluée après 20 minutes. L'élution est donc rapide. Au-delà de 1 heure la quantité d'enzyme éluée diminue. L'élution ne nécessite pas la présence du substrat; cependant ce dernier a une influence favorable qui doit résider dans son effet protecteur de l'enzyme.

Sol		Durée de contact dans la solution éluante			
		20 mn	1 h	1 h 45 mn	3 h
αJA	avec asparagine	1,45	1,60	1,51	1,14
	sans asparagine	1,01	1,05	0,92	0,86
αPR	avec asparagine	6,55	7,54	7,33	6,32
	sans asparagine	5,80	6,66	5,46	4,73

Tableau 29. — Influence de la présence d'asparagine et de la durée de contact du sol dans la solution éluante, sur l'élution de l'asparaginase. 12,5 g de sol αJA et αPR sont essorés après filtration de 25 cm³ de solution d'asparaginase purifiée, puis mélangés avec 25 cm³ de solution éluante contenant soit 40 % de tampon B3Na et 2 % d'asparagine, soit seulement 40 % de tampon. Après différents temps de contact la solution est séparée par filtration sur entonnoir de Buchner. 10 cm³ de filtrat sont mélangés avec 5 cm³ de solution-tampon 2PB3, contenant 2 % d'asparagine. 200 mg d'asparagine sont en outre ajoutés dans le cas où la solution éluante ne renferme pas de substrat. La durée de la réaction est de 5 heures à 49°. Les résultats sont exprimés en cm³ d'ammonium N/25.

2. Élution par filtration de la solution éluante à travers le sol

En procédant d'abord à l'élévation du pH puis à l'abaissement de la concentration saline, le sol étant mis successivement en contact avec deux solutions, comme cela est réalisé dans l'expérience rapportée au tableau 27, l'élution est plus importante. Ainsi l'activité de l'asparaginase éluée par contact du sol pendant une heure dans la solution éluante correspondait au maximum à 7,75 cm³ d'ammonium N/25 (tableau 28); par contre l'activité de l'asparaginase éluée dans la même expérience, par filtration à travers le sol d'une solution contenant 30 % de tampon B3Na et 2 % d'asparagine, puis d'une solution d'asparagine à 2 %, était au total de 9,67 cm³. Le sol est ici maintenu sur entonnoir de Buchner pendant l'ensemble des opérations d'adsorption et d'élution; la dispersion des colloïdes est ainsi très limitée et ne gène pas la filtration, contrairement à ce qui a lieu lorsque le sol est mis en suspension dans la solution éluante. En effectuant plusieurs filtrations successives avec la même solution borique, le filtrat étant remis sur le sol, la quantité d'asparaginase éluée est sensiblement égale à celle qui est éluée par une seule filtration; l'élution de l'enzyme n'est donc pas limitée par la rapidité de la filtration sous vide.

De même que pour l'élution par mise en suspension du sol dans la solution éluante, la quantité d'asparaginase éluée par filtration de la solution borique à travers le sol, dépend du pH et de la concentration saline de cette solution (tableau 30, première élution par la solution borique). Cependant la filtration ultérieure de la solution d'asparagine à 2 % permet d'éliminer l'effet défavorable de la concentration saline de la solution filtrée en premier lieu. L'élution la plus importante est obtenue par filtration d'une première solution contenant 30 % de tampon B3Na et 2 % d'asparagine, puis de la solution d'asparagine à 2 %.

Une quantité complémentaire d'asparaginase peut être éluée en effectuant une deuxième fois les opérations d'élution. Cette quantité est légèrement plus importante lorsque le cation de la deuxième solution borique est différent du cation présent dans la première solution (tableau 31).

Proportion de solution-tampon dans la solution borique	Solution-tampon B1Na			Solution-tampon B2Na			Solution-tampon B3Na		
	Première élution par la solution borique	Deuxième élution par la solution d'asparagine	Activité totale éluée	Première élution par la solution borique	Deuxième élution par la solution d'asparagine	Activité totale éluée	Première élution par la solution borique	Deuxième élution par la solution d'asparagine	Activité totale éluée
%									
10	5,14	1,89	7,03	4,93	—	—	5,65	2,10	7,75
30	4,67	2,27	6,94	6,98	2,36	9,34	7,67	2,18	9,85
50	3,07	3,56	6,63	6,50	2,40	8,90	7,19	2,23	9,42
75	2,01	4,83	6,84	4,40	4,36	8,76	6,31	2,69	9,00
100	1,50	6,76	8,26	4,01	4,93	8,94	4,92	3,82	8,74

Tableau 30. — *Influence du* pH *et de la concentration saline de la solution borique sur l'élution de l'asparaginase.* 12,5 g de sol αJA sont essorés après filtration de 20 cm³ de solution d'asparaginase purifiée. 25 cm³ de solution contenant 2 % d'asparagine et diverses proportions d'une solution-tampon borique B1Na, B2Na ou B3Na, sont ensuite filtrés à travers le sol; puis 25 cm³ de solution d'asparagine à 2 % sont également filtrés à travers le sol. 10 cm³ de filtrat sont mélangés avec 5 cm³ de solution-tampon 2PB3 contenant 2 % d'asparagine. La durée de la réaction est de 5 heures à 49°. Les résultats sont exprimés en cm³ d'ammonium N/25.

Proportion de solution-tampon B3Na ou B3K dans la troisième solution	Première élution par une solution contenant 30 % de tampon B3Na ou B3K et 2 % d'asparagine	Deuxième élution par une solution d'asparagine à 2 %	Troisième élution par une solution contenant 30, 50, 75 ou 100 % de tampon B3Na ou B3K et 2 % de asparagine	Quatrième élution par une solution d'asparagine à 2 %	Activité éluée
la première et la troisième solution sont sodiques					
30	4,54	1,47	0,71	0,54	7,26
50	«	«	0,61	0,59	7,21
75	«	«	0,59	0,78	7,38
100	«	«	0,61	0,88	7,50
la première solution est sodique et la troisième solution est potassique					
30	4,54	1,47	1,15	0,53	7,69
50	«	«	1,12	0,68	7,81
75	«	«	1,02	0,83	7,86
100	«	«	0,99	1,04	8,04
la première et la troisième solution sont potassiques					
30	4,36	1,09	0,64	0,55	6,64
50	«	«	0,71	0,65	6,81
75	«	«	0,70	0,75	6,90
100	«	«	0,70	0,87	7,02
la première solution est potassique et la troisième solution est sodique					
30	4,36	1,09	0,89	0,65	6,99
50	«	«	0,85	0,64	6,94
75	«	«	0,88	0,82	7,15
100	«	«	0,83	0,96	7,24

Tableau 31. — *Répétition des opérations d'élution. Influence de la concentration saline de la deuxième solution borique et du cation qu'elle contient.* 12,5 g de sol αJA sont essorés après filtration de 20 cm³ de solution d'asparaginase purifiée, puis quatre solutions sont filtrées successivement à travers le sol, à raison de 25 cm³ de chaque solution. La première et la troisième solution renferment un tampon borique et de l'asparagine à la concentration 2 %, la deuxième et la quatrième solution renferment uniquement de l'asparagine à la concentration 2 %. 10 cm³ de filtrat sont mélangés avec 5 cm³ de solution-tampon 2PB3 contenant 2 % d'asparagine. La durée de la réaction est de 5 heures à 49°. Les résultats sont exprimés en cm³ d'ammonium N/25.

La quantité totale la plus importante d'asparaginase éluée est obtenue par filtrations successives des quatre solutions suivantes: solution contenant 30 % de tampon B3Na et 2 % d'asparagine, solution d'asparagine à 2 %, solution-tampon B3K contenant 2 % d'asparagine et solution d'asparagine à 2 %.

Bien qu'une concentration saline élevée en milieu basique, soit un facteur défavorable à l'élution de l'enzyme, elle provoque une augmentation de l'activité de l'asparaginase de levure qui demeure fixée par le sol. En effet la filtration d'une solution contenant 50, 75 ou 100 % de tampon B1Na à travers le sol αMA enrichi en asparaginase de levure, provoque une augmentation de l'activité enzymatique du sol (tableau 32). Ceci traduit un mode de fixation de l'asparaginase de levure en milieu basique, différent de celui qui a lieu au pH du sol, dont la valeur est 4,6. La somme des activités de l'asparaginase éluée et de l'asparaginase qui reste fixée par le sol, est à peu près la même pour les différentes solutions utilisées, bien que le rapport de ces activités varie. L'asparaginase éluée et celle qui demeure fixée ont donc sensiblement la même aptitude à réagir avec le substrat.

Sol		Proportion de solution-tampon B1Na dans la solution éluante.					Sol avant élution
		10 %	25 %	50 %	75 %	100 %	
αMA	solution éluante....	2,87	2,55	1,37	0,85	0,52	3,85
	sol après élution....	2,98	3,14	4,19	4,53	4,58	
	somme des activités.	5,85	5,69	5,56	5,38	5,10	
αJA	solution éluante....	4,24	4,59	2,32	1,70	1,19	10,47
	sol après élution....	7,21	6,65	8,77	9,35	10,31	
	somme des activités.	11,45	11,24	11,09	11,05	11,50	

Tableau 32. — *Modification de l'activité de l'asparaginase qui demeure adsorbée après filtration de la solution éluante.* 12,5 g de sol αMA et αJA sont essorés après filtration de 20 cm³ de solution d'asparaginase purifiée, puis 25 cm³ de solution éluante contenant 2 % d'asparagine et différentes proportions de tampon B1Na sont filtrés à travers le sol. 10 cm³ de filtrat sont mélangés avec 5 cm³ de solution-tampon 2PB3 contenant 2 % d'asparagine. Les échantillons de terre humide essorés après filtration de la solution borique sont ajoutés en quantité correspondant à 5 g de sol sec à 15 cm³ de solution contenant 5 cm³ de solution-tampon 2PB3 et 2 % d'asparagine. La durée de la réaction est de 5 heures à 49°. Les résultats sont exprimés en cm³ d'ammonium N/25.

La production moyenne d'ammonium par ces deux fractions, après déduction de l'activité enzymatique préexistant dans le sol, est de 4,53 cm³ d'ammonium N/25 pour le sol αMA et de 9,78 cm³ pour le sol αJA. Par contre les activités mesurées avant l'élution correspondaient respectivement à 2,86 et 9,08 cm³ d'ammonium N/25. La diminution d'activité de l'enzyme, résultant de son adsorption dans le sol, est donc de 37 % pour le sol αMA et de 0,7 % pour le sol αJA. Ce comportement différent de l'enzyme dans les deux sols dont le pH est voisin (pH 4,6 et 5,6), peut traduire une influence de la nature des colloïdes sur le mode d'adsorption de l'asparaginase de levure. La proportion d'enzyme éluée ne peut donc être évaluée par rapport à l'activité mesurée avant l'élution, mais par rapport à l'activité totale des deux fractions éluée et non éluée. L'activité de l'asparaginase purifiée ajoutée à chacun des deux sols correspondait à 18,79 cm³ d'ammonium N/25; une proportion importante de l'enzyme de levure a donc été inactivée au cours des opérations. Cette proportion déterminée par rapport à l'activité totale des deux fractions éluée et non éluée, est de 75 % pour le sol αMA et de 48 % pour le sol αJA.

Lorsque les solutions boriques éluantes ont été en contact pendant 2 heures avec les sol αMA et αPR, en présence ou non d'asparagine puis mélangées avec l'asparaginase de levure et le milieu employé pour la mesure, l'activité de l'asparaginase de levure n'était pas modifiée. Ces solutions interviennent donc uniquement par leur action éluante sur l'asparaginase fixée par les sols.

Au tableau 33 sont rapportés les résultats des opérations d'élution effectuées sur cinq sols enrichis ou non en asparaginase de levure. L'élution de l'enzyme de levure est plus ou moins importante suivant les sols; elle peut atteindre 95 % de la fraction qui demeure active après adsorption et n'est pas inférieure à 63 % de celle-ci. La méthode d'élution est donc efficace; malgré cela l'asparaginase naturellement présente dans le sol n'a pu être éluée même en très faible proportion. De plus on n'a pas observé, après filtration des solutions éluantes à travers le sol, de modification appréciable de l'activité de l'asparaginase du sol. L'asparaginase adsorbée expérimentalement se différencie donc très nettement de l'asparaginase naturellement présente dans les sols. Ceci permet de conclure que, dans les conditions naturelles, le sol ne renferme pas d'asparaginase adsorbée, tout au moins en quantité mesurable.

SOLS			αMA	αJA	αPR	αRI	αFP
Mesures effectuées sur le sol non traité.....			0,91	1,37	2,59	0,95	3,93
Mesures effectuées sur les sols	avant élution	Traitement T.....	0,81	1,39	2,33	0,77	3,75
		Traitement A.....	2,28	9,74	6,07	5,74	5,70
	après élution	Traitement T.....	0,99	1,27	2,22	0,77	4,12
		Traitement A.....	2,27	3,30	2,97	3,19	4,52
		Différence : A — T = (D)	1,28	2,03	0,75	2,42	0,40
Mesures effectuées sur les solutions éluantes	Traitement T.....		0,01	0,00	0,04	0,04	0,05
	Traitement A.....		0,55	2,35	1,67	1,35	2,16
	Activité de l'enzyme éluée rapportée à 5 g de sol (E).....		2,20	9,40	6,68	5,40	8,64
Proportion d'enzyme éluée : $\frac{(E) \times 100}{(E) + (D)}$			63,2 %	82,2 %	90,0 %	69,1 %	95,6 %

Tableau 33. *Elution de l'asparaginase dans différents sols.* 12,5 g de sol sont essorés après filtration de 20 cm³ de solution d'asparaginase purifiée (série A) ou de 20 cm³ de solution d'asparaginase dans laquelle l'enzyme a été détruite par la chaleur (série T). Quatre solutions sont ensuite filtrées successivement à travers le sol, à raison de 25 cm³ de chacune d'elles. La première solution contient 30 % de tampon B3Na et 2 % d'asparagine; la deuxième et la quatrième solution renferment seulement de l'asparagine à la concentration 2 %; la troisième solution est constituée par le tampon B3K contenant 2 % d'asparagine. Les quatre filtrats provenant d'un même échantillon de sol sont mélangés; 10 cm³ de mélange sont ajoutés à 5 cm³ de solution-tampon 2PB3 contenant 2 % d'asparagine. Les échantillons de terre essorés après adsorption et après élution, sont ajoutés en quantité correspondant à 5 g de sol sec, à 15 cm³ de solution contenant 5 cm³ de solution-tampon 2PB3 et 2 % d'asparagine. La durée de la réaction est de 5 heures à 49°. Les résultats sont exprimés en cm³ d'ammonium N/25.

Les opérations d'élution ont lieu généralement quelques minutes après adsorption. L'élution a également été effectuée comparativement 30 minutes, 1 heure et 2 heures après l'adsorption (tableau 34). Les résultats obtenus montrent que l'extraction de l'asparaginase est d'autant moins importante que les opérations d'élution ont été effectuées plus longtemps après l'adsorption; mais il se produit simultanément une inactivation de plus en plus importante de l'enzyme adsorbée. La proportion éluée déterminée par rapport à l'asparaginase qui demeure active est, respectivement de 88,2 %, 81,0 %, 76,5 % et 71,8 % pour les élutions effectuées immédiatement ou bien 30 minutes, 1 heure ou 2 heures après l'adsorption.

	Traitement	Temps qui sépare l'adsorption de l'élution			
		0	30 mn	1 h	2 h
Activité du sol avant élution.....	T	1,43	1,35	1,28	1,30
	A	10,11	9,41	8,39	8,21
	différence	8,68	8,06	7,11	6,91
Activité du sol après élution.....	T	1,35	—	—	—
	A	2,83	3,42	3,50	3,94
	différence	1,48	2,07	2,15	2,59
Somme des activités éluées.....	T	0,08	—	—	—
	A	10,98	8,80	7,00	6,58
Proportion d'enzyme éluée.....	A	88,2 %	81,0 %	76,5 %	71,8 %

Tableau 34. — *Influence du temps qui s'écoule entre l'adsorption et l'élution, sur la proportion d'enzyme éluée.* 12,5 g de sol αJA sont essorés après filtration de 20 cm³ de solution d'asparaginase purifiée (série A) ou de 20 cm³ de solution d'asparaginase dans laquelle l'enzyme a été détruite par la chaleur (série T). Puis, soit immédiatement soit après un temps plus ou moins long, quatre solutions sont filtrées successivement à travers le sol, à raison de 25 cm³ de chacune d'elles. La première solution contient 30 % de tampon B3Na et 2 % d'asparagine; la deuxième et la quatrième solution renferment seulement de l'asparagine à la concentration 2 %; la troisième solution est constituée par le tampon B3K contenant 2 % d'asparagine. Les filtrats correspondant à un même traitement sont mélangés; 10 cm³ de mélange sont ajoutés à 5 cm³ de solution-tampon 2PB3 contenant 2 % d'asparagine. Les échantillons de terre humide, essorés avant ou après élution, sont ajoutés en quantité correspondant à 5 g de sol sec, à 15 cm³ de solution contenant 5 cm³ de solution-tampon 2PB3 et 2 % d'asparagine. La durée de la réaction est de 5 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

L'étude de l'adsorption et de l'élution de l'asparaginase de levure dans les sols a été effectuée avec des extraits purifiés, dans le but d'éviter l'interférence des substances qui floculent en milieu acide et entraînent l'enzyme. On peut cependant formuler l'objection suivant laquelle, dans les conditions naturelles, ces substances augmentent la stabilité de l'asparaginase libérée dans le sol après la mort des cellules et s'opposent à son élution. Pour vérifier l'intervention éventuelle de ce facteur, l'extrait brut a été ajouté en proportion élevée aux sols αPR et αFP: 25 cm³ d'extrait pour 50 g de sol. Le mélange a été ensuite séché rapidement sous ventilateur puis mis en contact pendant une heure avec la solution éluante contenant 40 % de tampon B3Na et 2 % d'asparagine. L'activité de l'asparaginase de levure dans l'extrait utilisé correspondait à 18,75 cm³ d'ammonium N/25. Après addition aux sols puis séchage du mélange, l'enzyme de levure produisait respectivement 0,82 et 1,90 cm³ d'ammonium N/25 dans les sols αPR et αFP. Une fraction de l'enzyme ajoutée au sol a donc résisté à la dessication. Mais lors du contact ultérieur du sol séché avec la solution éluante, une quantité assez importante d'enzyme de levure est passée en solution. L'asparaginase éluée produisait respectivement 0,91 et 3,0 cm³ d'ammonium N/25 pour les sols αPR et αFP. La stabilité de l'enzyme dans le sol n'est donc pas un obstacle à son élution. Il en résulte que l'asparaginase naturellement présente dans les sols, qui est stable à la dessication et ne peut être extraite dans les mêmes conditions, ne se trouve pas sous forme adsorbée. La conclusion précédente est ainsi confirmée.

V. — ÉTUDE COMPARÉE DE DIVERS FACTEURS SUR L'ASPARAGINASE DES SOLS ET L'ASPARAGINASE DES CELLULES DE LEVURE

L'impossibilité d'éluer l'asparaginase naturellement présente dans les sols est en accord avec l'hypothèse de sa localisation dans les cellules des microorganismes. Nous avons recherché ici d'autres propriétés de l'asparaginase du sol susceptibles de découler de cette situation de l'enzyme. Pour étayer les conclusions de cette étude, nous avons, en outre, confronté le comportement de l'asparaginase du sol et celui de l'asparaginase présente dans les cellules de levure.

Asparaginase des sols.

1. — Influence de traitements du sol par la chaleur sur l'activité de l'asparaginase

Le chauffage du sol en suspension dans l'eau, préalablement à la mesure de l'activité de l'asparaginase, provoque une diminution de l'activité de l'enzyme, diminution d'autant plus importante que la température du traitement préalable est plus élevée (fig. XXII/A). En présence de tampon le traitement thermique a sensiblement le même effet (fig. XXII/C et XXIII); son influence ne dépend donc pas du pH. L'effet du traitement n'est pas proportionnel à sa durée: l'abaissement d'activité de l'asparaginase dû aux 30 premières minutes est bien supérieur à celui qui résulte d'une prolongation du traitement pendant 1 heure 30 minutes (fig. XXIV). L'effet du traitement thermique est atténué par la présence d'asparagine ou d'arséniate (fig. XXII/B, XXII/D et XXII/E).

A la figure XXV sont rapportés les résultats de traitements effectués sur plusieurs sols et dans une plus large zone de températures. L'effet protecteur du substrat et de l'arséniate se retrouve pour tous les sols étudiés; il se traduit d'abord par la présence d'un palier entre 30° et 45°, puis au-delà de 45° par une perte d'activité nettement inférieure à celle qui résulte du traitement dans l'eau ou le tampon PB3 aux mêmes températures.

D'après S. SPIEGELMANN (88), la stabilité des enzymes dans les cellules, en relation avec la présence du substrat, pourrait être attribuée aux interactions compétitives entre systèmes formateurs d'enzymes. L'auteur rapporte que des interactions ont été mises en évidence dans les cellules de levure où, en l'absence d'azote exogène, la synthèse de galactozymase s'accompagne d'une diminution de la teneur des cellules en glucozymase. Par contre, en présence d'azote exogène, la formation de galactozymase ne provoque pas de diminution de la teneur en glucozymase. Ceci montre que l'interaction réside dans une compétition pour un composé azoté. Inversement en l'absence de galactose la galactozymase disparaît progressivement lorsque les cellules fermentent le glucose. L'addition d'azide de sodium empêche toute disparition ultérieure de galactozymase. L'azide dissocierait la production d'énergie de son utilisation pour les synthèses. L'action protectrice du substrat et de l'azide de sodium peut être rapprochée de celle qui est observée dans les sols en présence d'asparagine et d'arséniate. Cette analogie permet de présumer que l'asparaginase du sol est localisée dans des cellules actives capables de synthèses. L'influence de l'azide de sodium sur la stabilité de l'asparaginase du sol n'a pu être déterminée, ce corps ayant un effet dépressif sur l'activité de l'enzyme (fig. XXVI).

A 55° et 60° l'effet protecteur du substrat est généralement plus grand que celui de l'arséniate (fig. XXV). Entre 30° et 45° le palier dû à la présence de substrat se situe au-dessous de celui qui correspond à l'arséniate; le décalage résulte de ce que l'activité enzymatique n'est pas identique

dans les milieux renfermant les tampons PB3 et PBAs2. L'activité de l'asparaginase est sensiblement la même avec ou sans arséniate (fig. XXVII). Il n'y a donc pas addition des effets protecteurs de l'arséniate et du substrat, ce qui semble indiquer, en accord avec l'hypothèse précédente, que l'arséniate et le substrat interviennent sur la même cause d'instabilité.

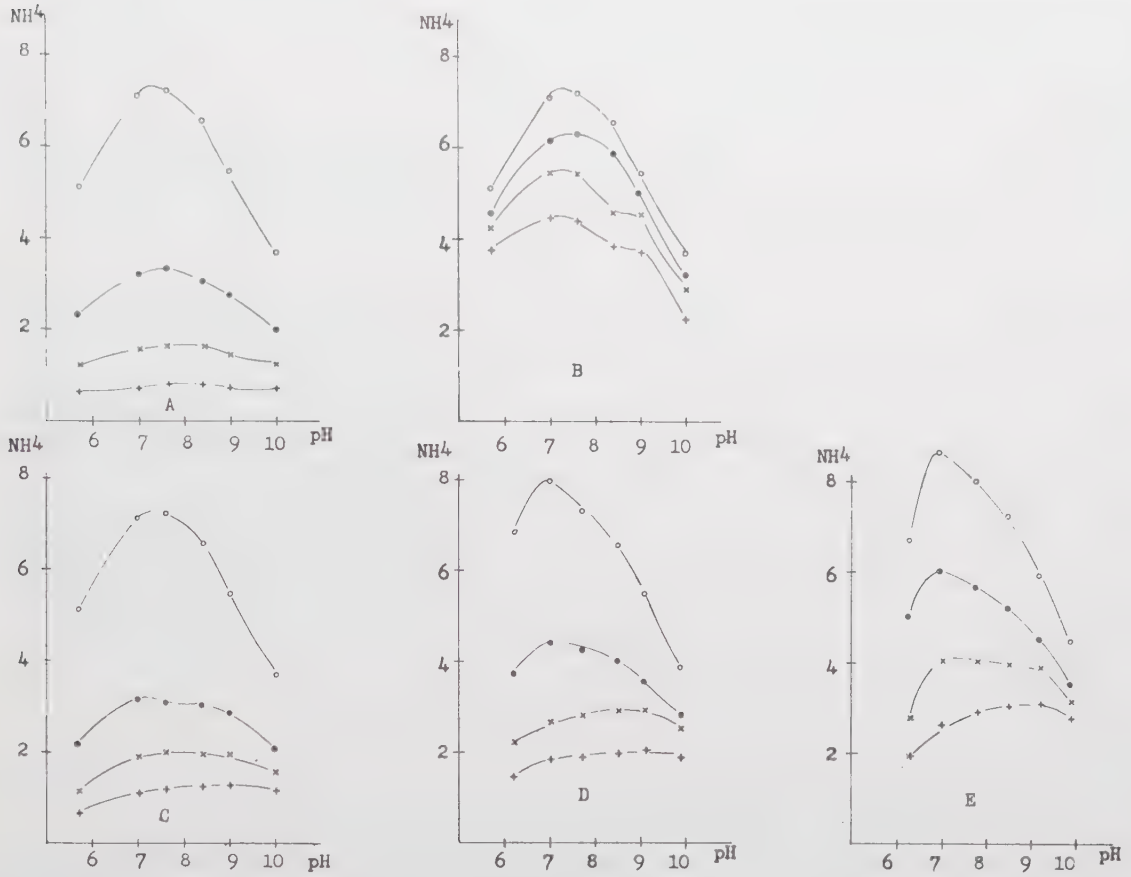


Fig. XXII. — ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE, MESURÉE APRÈS TRAITEMENT DU SOL A DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES, EN PRÉSENCE OU ABSENCE DE SUBSTRAT

3 g de sol FP + 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon PB ou PBAs et 1,66 % d'asparagine; 21 heures à 49°.

● Traitement préalable de 30 minutes à 49°
× — — — — à 55°
\+ — — — — à 60°
○ Témoin (sans traitement préalable).

A) Traitement préalable effectué sur 3 g de sol, dans 5 cm³ d'eau; 10 cm³ de solution-tampon PB1 à PB6, contenant 2,5 % d'asparagine, sont ajoutés pour la mesure.

B) Traitement préalable effectué sur 3 g de sol, dans 5 cm³ de solution d'asparagine à 2 %; 10 cm³ de solution-tampon PB1 à PB6, contenant 1,5 % d'asparagine, sont ajoutés pour la mesure.

C) Traitement préalable effectué sur 3 g de sol, dans 10 cm³ de solution-tampon PB1 à PB6; 5 cm³ de solution d'asparagine à 5 % (sursaturée), sont ajoutés pour la mesure.

D) Traitement préalable effectué sur 3 g de sol, dans 10 cm³ de solution-tampon PBAs/a1 à PBAs/a6 (concentration en arséniate : 0,5 M); 5 cm³ de solution d'asparagine à 5 % (sursaturée), sont ajoutés pour la mesure.

E) Traitement préalable effectué sur 3 g de sol, dans 10 cm³ de solution-tampon PBAs1 à PBAs6 (concentration en arséniate : M); 5 cm³ de solution d'asparagine à 5 % (sursaturée), sont ajoutés pour la mesure.

Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

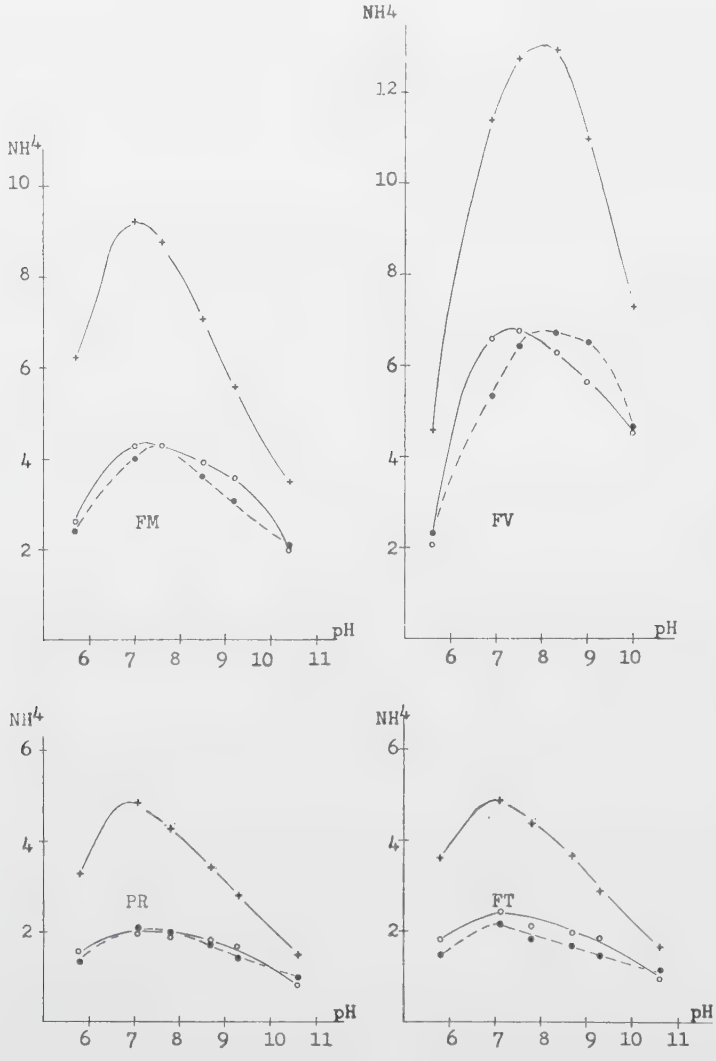


Fig. XXIII. — ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE MESURÉE APRÈS TRAITEMENT DU SOL A 49°, DANS L'EAU OU UN TAMPON PB, EN L'ABSENCE DU SUBSTRAT

3 g du sol FM, FV ou 5 g de sol PR, FT, + 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon PB1 à PB6 et 1,66 % d'asparagine; 21 heures à 49°.

● Traitement préalable effectué sur 3 g ou 5 g de sol, dans 5 cm³ d'eau; 10 cm³ de solution-tampon PB1 à PB6, contenant 2,5 % d'asparagine sont ajoutés pour la mesure.

o Traitement préalable effectué sur 3 g ou 5 g de sol, dans 10 cm³ de solution-tampon PB1 à PB6; 5 cm³ de solution d'asparagine à 5 % (sursaturée), sont ajoutés pour la mesure.

+ Témoin (sans traitement préalable).

Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

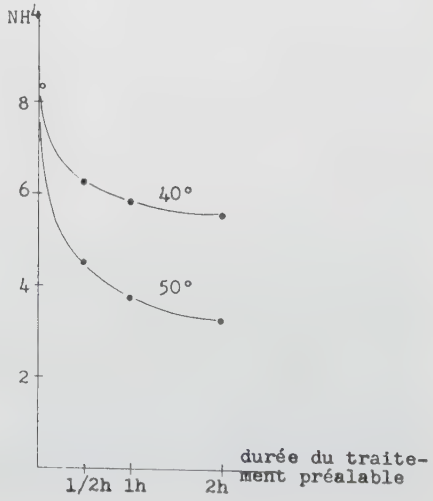


Fig. XXIV. — ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE, MESURÉE APRÈS TRAITEMENT DU SOL A 40° OU 50° EN L'ABSENCE DE SUBSTRAT. INFLUENCE DE LA DURÉE DU TRAITEMENT

5 g de sol δFP + 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon PB3 et 1,66 % d'asparagine; 21 heures à 49°.

Le sol est préalablement maintenu dans 10 cm³ de solution-tampon PB3 pendant 1/2 h, 1 h ou 2 heures à 40° ou 50°; 5 cm³ de solution d'asparagine à 5 % (sursaturée) sont ajoutés pour la mesure.

Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

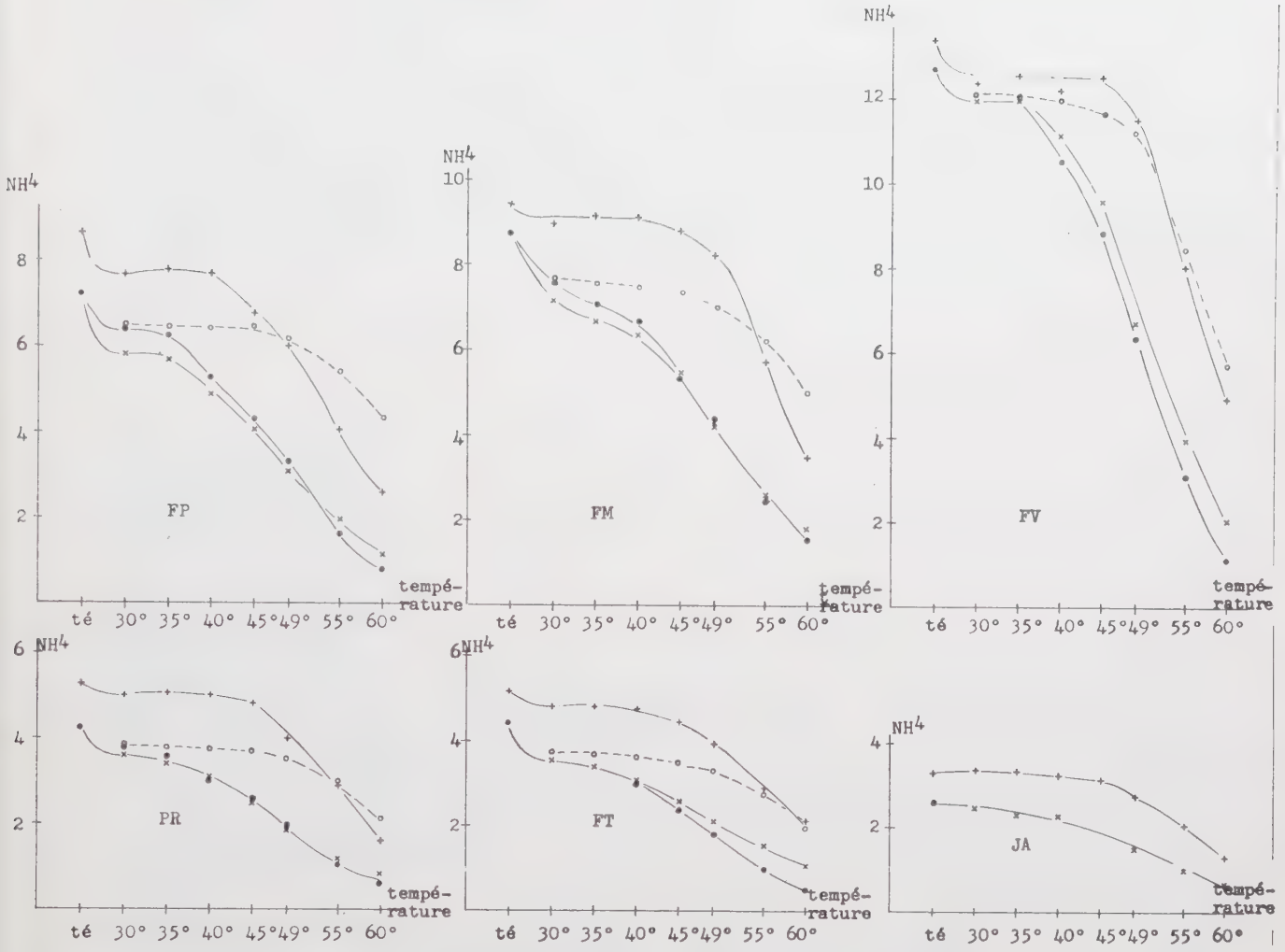


Fig. XXV. — ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE, MESURÉE APRÈS TRAITEMENT DU SOL A DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES, EN PRÉSENCE OU ABSENCE DE SUBSTRAT

3 g de sol FP, FM ou FV, ou 5 g de sol PR, FT ou JA + 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon PB3 ou PBAs2 et 1,66 % d'asparagine; 21 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

● Traitement préalable effectué sur 3 g ou 5 g de sol, dans 5 cm³ d'eau; 10 cm³ de solution-tampon PB3 contenant 2,5 % d'asparagine, sont ajoutés pour la mesure.

○ Traitement préalable effectué sur 3 g ou 5 g de sol, dans 5 cm³ de solution d'asparagine à 2 %; 10 cm³ de solution-tampon PB3 contenant 1,5 % d'asparagine, sont ajoutés pour la mesure.

× Traitement préalable effectué sur 3 g ou 5 g de sol, dans 10 cm³ de solution-tampon PB3; 5 cm³ de solution d'asparagine à 5 % (sursaturée), sont ajoutés pour la mesure.

+ Traitement préalable effectué sur 3 g ou 5 g de sol, dans 10 cm³ de solution-tampon PBAs2; 5 cm³ de solution d'asparagine à 5 % sont ajoutés pour la mesure.

té- sol mis directement dans les 15 cm³ de solution.

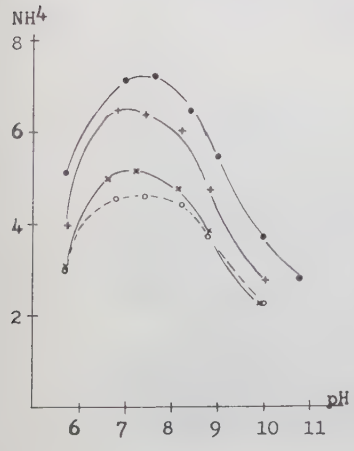


Fig. XXVI. — INFLUENCE DE L'AZIDE DE SODIUM SUR L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE DU SOL FP

3 g de sol + 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon PB1 à PB6, 1,66 % d'asparagine et différentes concentrations d'azide de sodium. 21 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

Concentration en azide de sodium { • 0 % ; + 1,66 % ; × 3,33 %

○ Le sol est maintenu, préalablement à la mesure, dans 5 cm³ de solution d'azide de sodium à 5 %, pendant 30 minutes à 25°; puis 10 cm³ de solution-tampon PB1 à PB6 contenant 2,5 % d'asparagine, sont ajoutés pour la mesure. (Concentration finale en azide : 1,66 %).

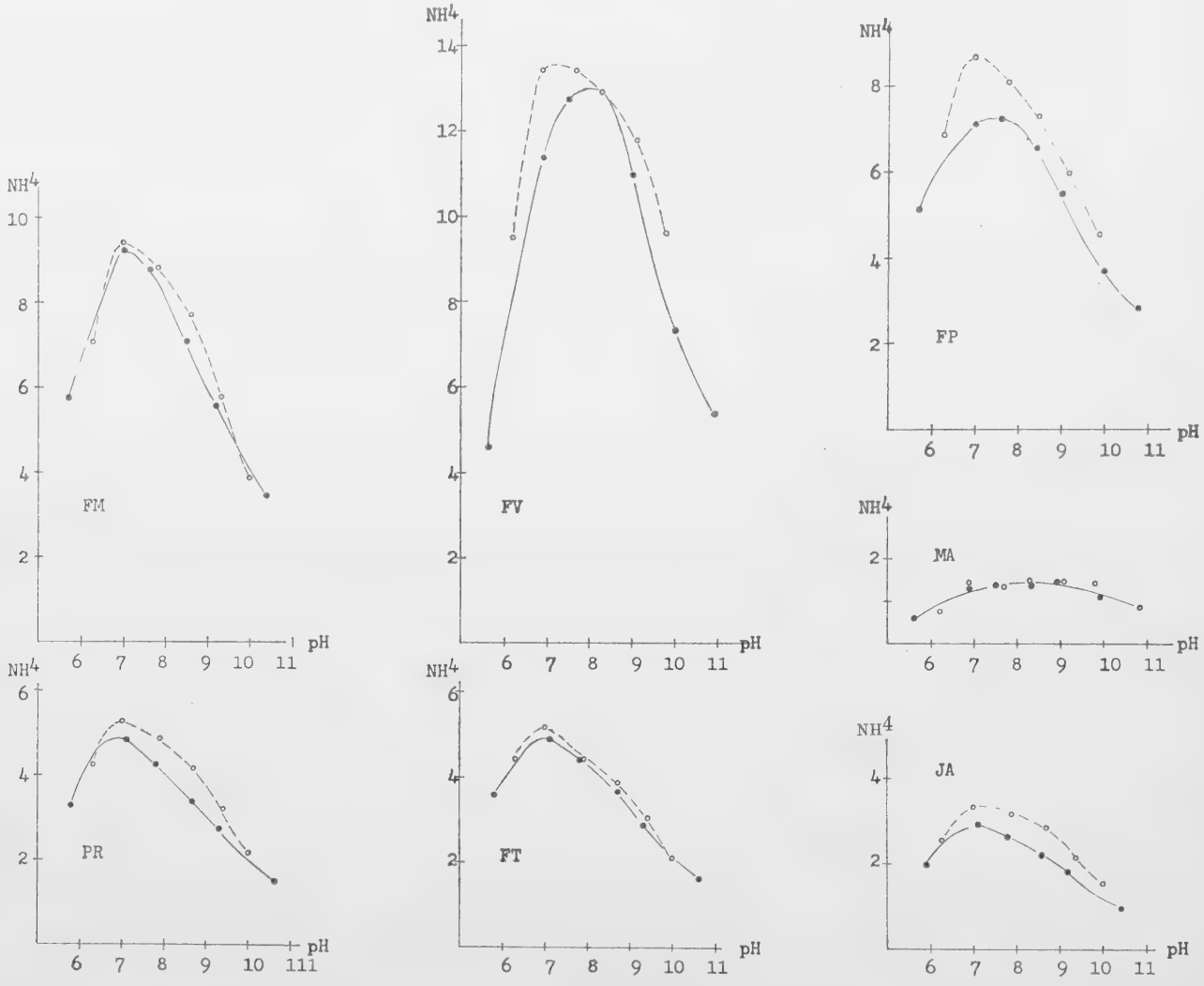


Fig. XXVII. — ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE DES SOLS EN PRÉSENCE ET EN L'ABSENCE D'ARSÉNIATE
3 g de sol FP, FM, FV, ou 5 g de sol MA, PR, FT ou JA, + 10 cm³ de solution-tampon PB1 à PB6 ou PBAs1 à PBAs6, contenant 2,5 % d'asparagine. 21 heures à 49°. Les résultats sont exprimés en cm³ d'ammonium N/25.
• Tampons PB1 à PB6.
○ Tampons PBAs1 à PBAs6.

Le traitement du sol à 45° ou au-dessous de cette température, en présence d'asparagine, s'accompagne d'une diminution de l'activité enzymatique (fig. XXV). La protection de l'enzyme par le substrat n'est donc pas totale même aux faibles températures. Par ailleurs nous avons constaté (fig. VII), qu'une fraction de l'activité de l'asparaginase disparaît au cours des premières heures de la réaction. Ces faits pourraient traduire l'intervention d'une deuxième cause de diminution de l'activité enzymatique, indépendante du substrat, qui résiderait dans une modification de la perméabilité des cellules ou dans l'action de facteurs de régulation de l'activité cellulaire, sous l'influence de la température.

Lors du traitement du sol par la chaleur en l'absence de substrat, il se produit également une diminution d'activité de l'asparaginase A. (fig. XXVIII/A). L'effet thermique est ici moins accusé en présence de tampon qu'en présence d'eau, alors qu'il est le même dans les deux cas pour l'aspara-

ginase B (fig. XXVIII/B). En outre, la présence de substrat, lors du traitement du sol à 49°, n'a pratiquement aucun effet protecteur sur l'asparaginase A (fig. XXIX/A et XXX/A) contrairement à ce qui a lieu pour l'asparaginase B (fig. XXIX/B et XXX/B). Cette différence de comportement des deux enzymes en présence de substrat, découle vraisemblablement du décalage de leur zone pH d'activité, lequel traduit une inégale aptitude des deux enzymes à se combiner avec le substrat en milieu acide. Or, les traitements effectués dans la solution d'asparagine ont lieu au pH du sol, donc en milieu acide; dans ces conditions, seule l'asparaginase B qui se combine avec le substrat peut être protégée par celui-ci.

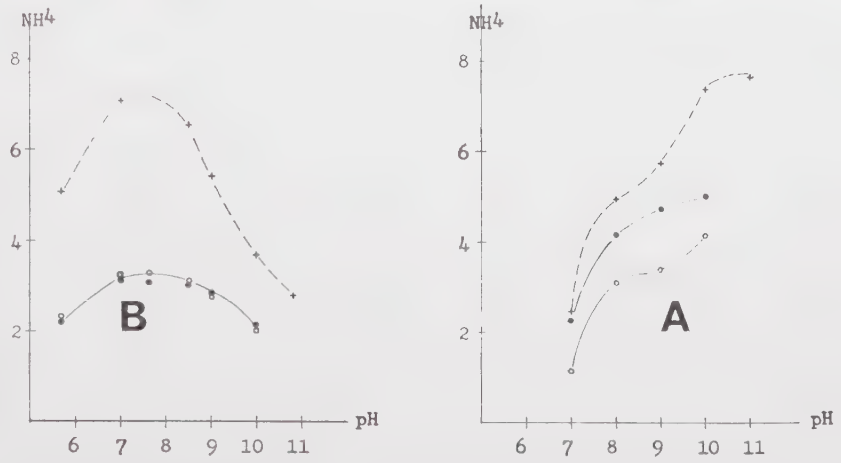


Fig. XXVIII. — INFLUENCE COMPARÉE, SUR LES ASPARAGINASES A ET B, DU TRAITEMENT DU SOL FP PENDANT 30 MINUTES A 49°, EN L'ABSENCE DE SUBSTRAT

3 g de sol + 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon P1 à P7 ou PB1 à PB7 et 1,66 % d'asparagine, 21 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

B - Résultats des traitements correspondant aux tampons PB.
A - Différence, pour un même pH, entre les résultats des traitements correspondant aux tampons PB et ceux des traitements homologues correspondant aux tampons P.
\+ - Témoin. Sol mis directement dans les 15 cm³ de solution.
• - Traitement préalable effectué sur 3 g de sol, dans 10 cm³ de solution-tampon; 5 cm³ de solution d'asparagine à 5 % sont ajoutés pour la mesure.
o - Traitement préalable effectué sur 3 g de sol, dans 5 cm³ d'eau; 10 cm³ de solution-tampon contenant 2,5 % d'asparagine sont ajoutés pour la mesure.

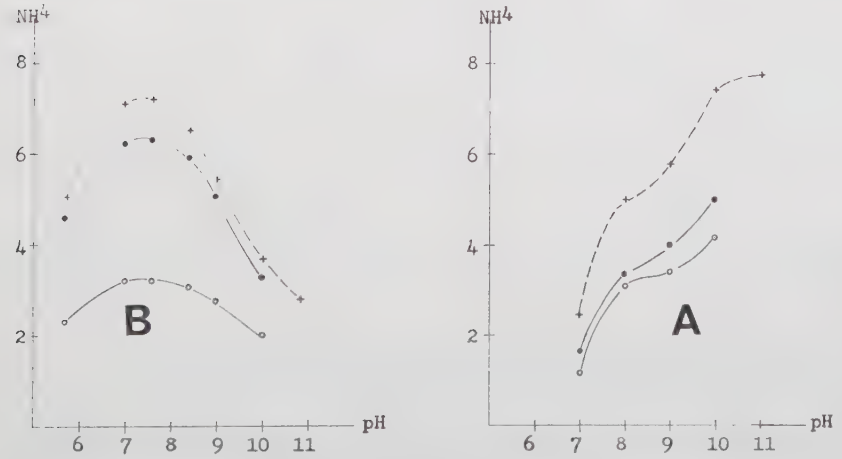


Fig. XXIX. — INFLUENCE COMPARÉE, SUR LES ASPARAGINASES A ET B, DU TRAITEMENT DU SOL FP PENDANT 30 MINUTES A 49°, EN PRÉSENCE OU ABSENCE DE SUBSTRAT

3 g de sol + 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon P1 à P7 ou PB1 à PB7 et 1,66 % d'asparagine. 21 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

B - Résultats des mesures effectuées en présence de tampon PB.
A - Différence, pour une même valeur pH, entre les mesures effectuées en présence de tampon PB et les mesures homologues effectuées en présence de tampon P.
\+ - Témoin. Sol mis directement dans les 15 cm³ de solution.
• - Traitement préalable effectué sur 3 g de sol, dans 5 cm³ de solution d'asparagine à 2 %; 10 cm³ de solution-tampon contenant 1,5 % d'asparagine sont ajoutés pour la mesure.
o - Traitement préalable effectué sur 3 g de sol, dans 5 cm³ d'eau; 10 cm³ de solution-tampon contenant 2,5 % d'asparagine sont ajoutés pour la mesure.

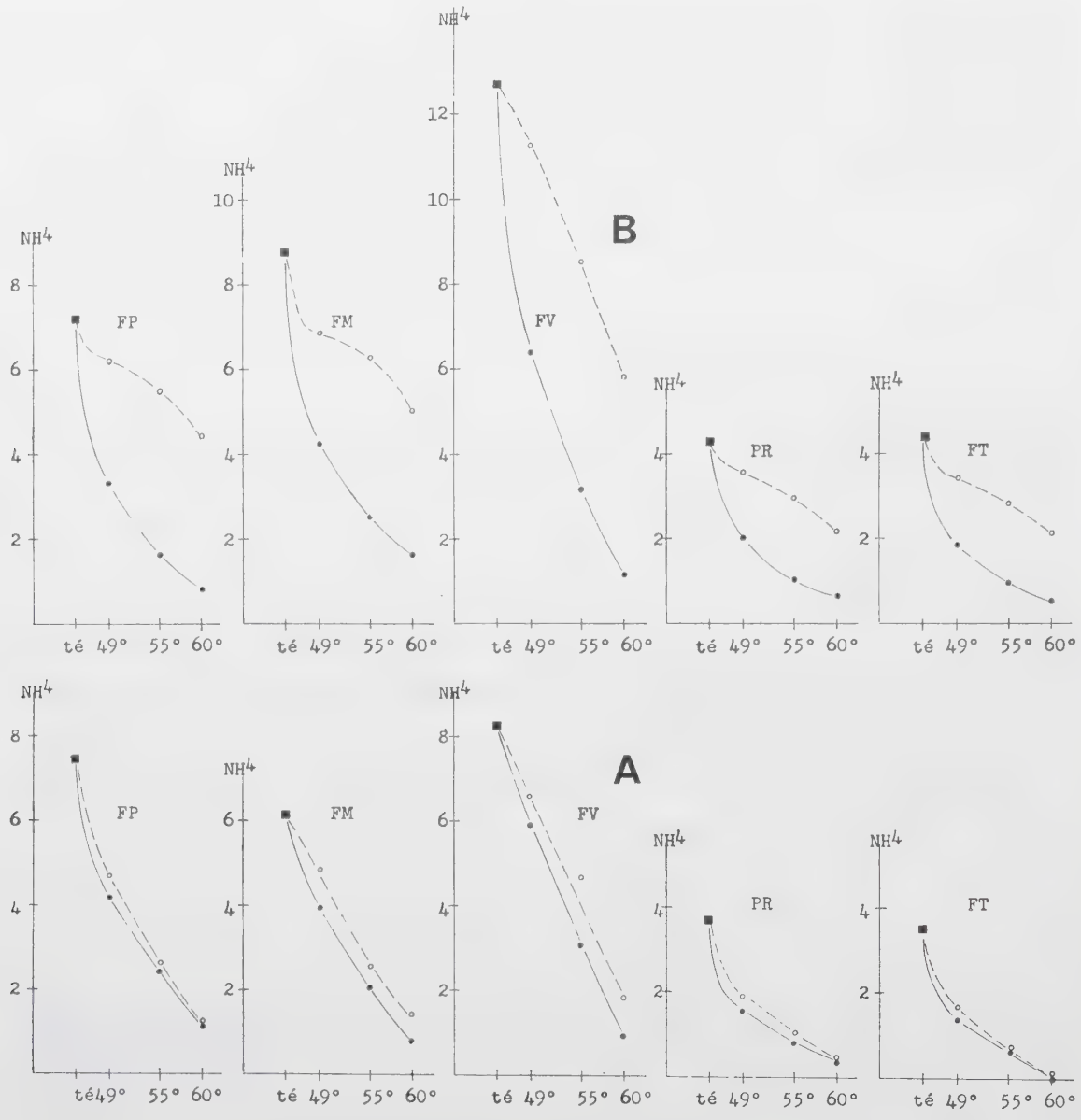


Fig. XXX. — INFLUENCE COMPARÉE, SUR LES ASPARAGINASES A ET B, DU TRAITEMENT DES SOLS PENDANT 30 MINUTES A DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES, EN PRÉSENCE OU ABSENCE DE SUBSTRAT

3 g de sol FP, FM ou FV, ou 5 g de sol PR ou FT, + 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon PB3, PB6 ou PAs6 et 1,66 % d'asparagine. 21 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

B - Résultats des mesures effectuées en présence de tampon PB3.

A - Différence entre les mesures effectuées en présence de tampon PAs6 et les mesures homologues effectuées en présence de tampon PB6.

■ - té Témoin : Sol mis directement dans les 15 cm³ de solution.

o - Traitement préalable effectué sur 3 g ou 5 g de sol dans 5 cm³ de solution d'asparagine à 2 %; 10 cm³ de solution-tampon contenant 1,5 % d'asparagine, sont ajoutés pour la mesure.

● - Traitement préalable effectué sur 3 g ou 5 g de sol. dans 5 cm³ d'eau; 10 cm³ de solution-tampon contenant 2,5 % d'asparagine, sont ajoutés pour la mesure.

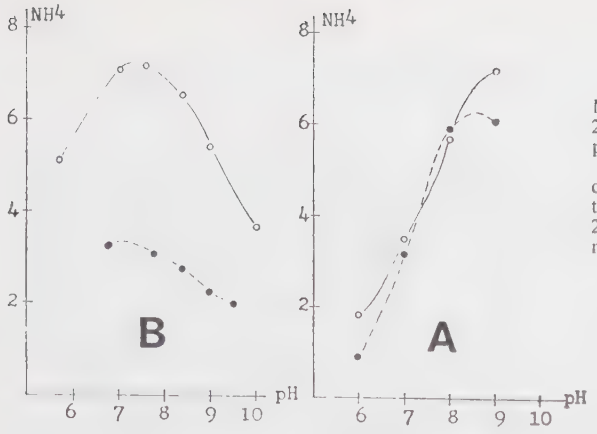


Fig. XXXI. — INFLUENCE DU CARBONATE SUR LA STABILITÉ DES ASPARAGINASES A ET B, A 55°, EN L'ABSENCE DE SUBSTRAT

1 litre de solution de bicarbonate de sodium à la concentration M, amené à 55°, est filtré sur entonnoir de Buchner, à travers 220 g de sol FP. Le sol est ensuite lavé par 1 litre d'eau froide puis essoré.

3 g de sol sec ou 5,65 g de sol essoré (correspondant à 3 g de sol sec), + 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon PB1 à PB6 ou PAs1 à PAs6 et 1,66 % d'asparagine; 21 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

B Mesures réalisées en présence de tampon PB.
o - Sol non traité.
● - Mesures effectuées après traitement du sol à 55°, par la solution de carbonate.
A Différence, pour une même valeur pH, entre les mesures effectuées, d'une part, en présence de tampon PB et, d'autre part, en présence de tampon PAs.
o - Sol non traité.
● - Mesures effectuées après traitement du sol à 55°, par la solution de carbonate.

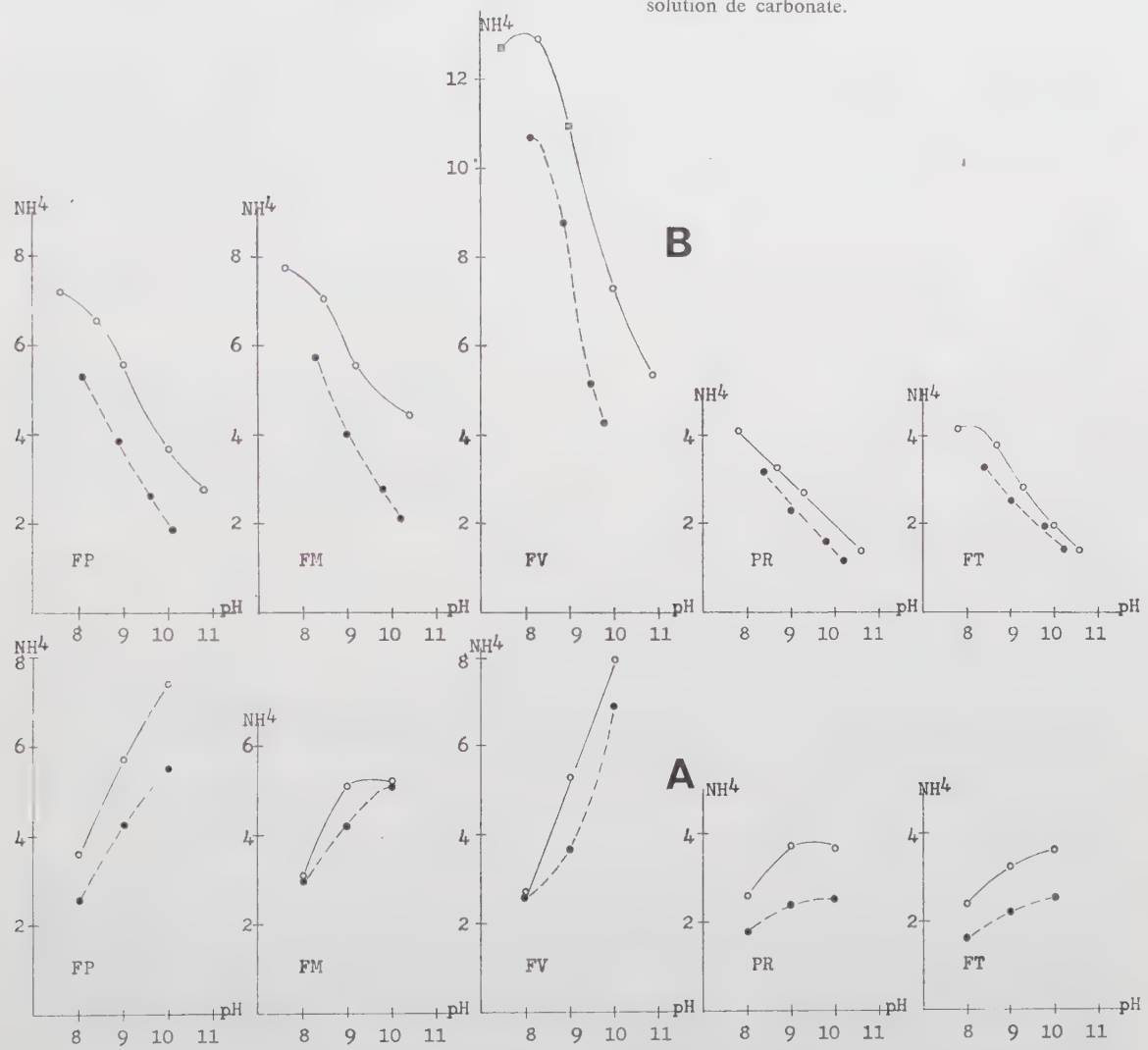


Fig. XXXII. — INFLUENCE DU CARBONATE SUR L'ACTIVITÉ DES ASPARAGINASES A ET B

3 g de sol FP, FM ou FV, ou 5 g de sol PR ou FT, + 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon PAs2 à PAs6 ou PB3 à PB6 et 1,66 % d'asparagine; ou 15 cm³ de solution-tampon Cb1 à Cb4 ou CAs1 à CAs4 (concentration en carbonate : 0,66 M), contenant 1,66 % d'asparagine. 21 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

B o - Mesures effectuées en présence de tampon PB.
● - — — — — Cb.
A o - Différence, pour une même valeur pH, entre les mesures effectuées, d'une part, en présence de tampon PB et, d'autre part, en présence de tampon PAs.
● - Différence, pour une même valeur pH, entre les mesures effectuées, d'une part, en présence de tampon Cb et, d'autre part, en présence de tampon CAs.

Les asparaginases A et B se différencient également par l'effet protecteur du carbonate. En présence de bicarbonate à la concentration M, l'asparaginase A n'est pratiquement pas affectée par le traitement du sol à 55°, alors que la moitié de l'activité de l'asparaginase B disparaît dans ces conditions (fig. XXXI). Cependant le carbonate a un effet dépressif analogue sur l'activité des asparaginases A et B (fig. XXXII).

2. Influence de traitements préalables du sol par le nitrate sur l'activité de l'asparaginase

Lorsque le sol est mis en suspension dans une solution de nitrate de potassium puis maintenu pendant 30 minutes à 40°, préalablement à la mesure de l'activité de l'asparaginase, on observe une diminution de l'activité de l'enzyme. Cette diminution est plus importante que celle qui résulte du séjour du sol à la même température, dans l'eau. Elle est d'autant plus grande que la concentration en nitrate est plus élevée (fig. XXXIII). Le substrat a un effet protecteur très marqué aux concentrations peu élevées en nitrate : la réduction d'activité est faible ou nulle aux concentrations M/20 et M/40; elle est très importante à la concentration M/2,5.

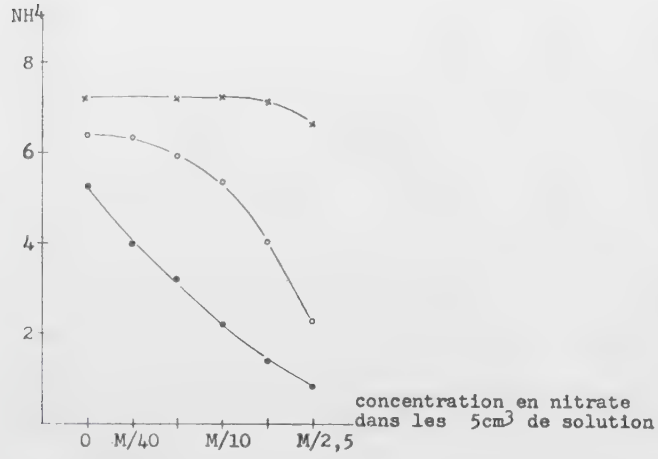


Fig. XXXIII. — ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE, MESURÉE APRÈS TRAITEMENT DU SOL PENDANT 30 MINUTES, A 40°, EN PRÉSENCE OU ABSENCE DE SUBSTRAT, DANS LES SOLUTIONS CONTENANT DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE NITRATE DE POTASSIUM

3 g de sol FP + 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon PB3, 1,66 % d'asparagine et différentes concentrations de nitrate de potassium. 21 heures à 49°. Les résultats sont exprimés en cm³ d'ammonium N/25.

● Traitement préalable effectué sur 3 g de sol, dans 5 cm³ d'eau ou de solution de nitrate de potassium; 10 cm³ de solution-tampon PB3 contenant 2,5 % d'asparagine, sont ajoutés pour la mesure.

o Traitement préalable effectué sur 3 g de sol, dans 5 cm³ de solution d'asparagine à 2 % ou de solution de nitrate de potassium contenant 2 % d'asparagine; 10 cm³ de solution-tampon PB3 contenant 1,5 % d'asparagine sont ajoutés pour la mesure.

× Témoin. Le sol est mis directement dans les 15 cm³ de solution correspondant à chaque traitement.

Une double influence du nitrate a été mise en évidence au chapitre III de la première partie de cette étude. A concentration élevée, le nitrate avait un effet dépressif; par contre, aux faibles concentrations, il provoquait une augmentation d'activité de l'asparaginase. Celle-ci intervenait au-delà de la dixième heure de la réaction et n'avait pas lieu en présence de borate. La courte durée du contact du sol dans la solution de nitrate, avant l'addition du tampon borique, ne permet donc pas ici à l'influence favorable du nitrate de se manifester.

L'action du nitrate est plus accusée en milieu acide que vers la neutralité (fig. XXXV). L'influence du pH ressort également de l'examen de la figure XXXIV (courbe témoin avec nitrate, sans traitement préalable). Dans les conditions de la mesure (pH 7,5 à pH 8,0) l'effet du nitrate est peu important; l'influence de ce corps ne réside donc pas dans une action inhibitrice de l'activité de l'aspa-

raginase. Elle pourrait résider dans une compétition entre systèmes formateurs d'asparaginase et de nitrate réductase suivant la notion définie par S. SPIEGELMANN. Cependant, aux concentrations élevées en nitrate, l'effet protecteur du substrat est très faible; le nitrate pourrait donc intervenir également sur des facteurs indépendants du substrat, tels que la perméabilité des cellules ou des processus de régulation de l'activité cellulaire. Ces résultats sont donc, comme ceux du traitement thermique et des essais d'élution, en accord avec l'hypothèse suivant laquelle l'asparaginase du sol serait liée aux structures cellulaires.

Fig. XXXIV. — INFLUENCE DU TRAITEMENT DU SOL PAR LE NITRATE, SUR L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE

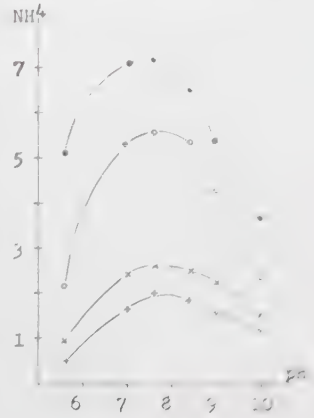
3 g de sol FP + 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon PB1 à PB6, 1,66 % d'asparagine et du nitrate à la concentration M/3. 21 heures à 49°. Les résultats sont exprimés en cm³ d'ammonium N/25.

+ Le traitement préalable est effectué sur 3 g de sol, maintenus pendant 30 minutes à 25°, dans 5 cm³ de solution de nitrate de potassium à la concentration M; 10 cm³ de solution-tampon PB1 à PB6, contenant 2,5 % d'asparagine, sont ajoutés pour la mesure.

× Le traitement préalable est effectué sur 3 g de sol, maintenus pendant 30 minutes à 25°, dans 5 cm³ de solution de nitrate de potassium à la concentration M, contenant 2 % d'asparagine; 10 cm³ de solution-tampon PB1 à PB6, contenant 1,5 % d'asparagine sont ajoutés pour la mesure.

o Témoin sans traitement préalable. Le sol est mis directement dans les 15 cm³ de solution.

● Témoin sans traitement préalable et sans nitrate. Le sol est mis directement dans les 15 cm³ de solution contenant seulement le tampon et l'asparagine.



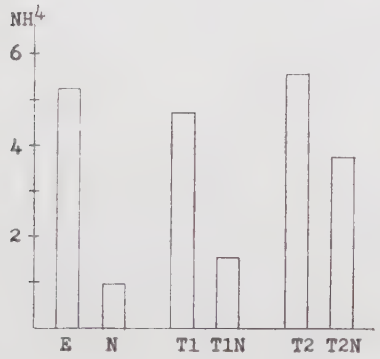


Fig. XXXV. — INFLUENCE DU pH SUR LA RÉDUCTION D'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE DU SOL PAR LE NITRATE

3 g de sol FP sont maintenus pendant 30 minutes à 40° dans 5 cm³ d'eau (E) ou de solution de phosphate monospotasique à la concentration 0,4 M (T1; pH de la suspension : 4,6) ou de solution-tampon-phosphate de concentration 0,4 M (T2; pH de la suspension : 6,6). Dans les traitements homologues (N, T1N, T2N), les solutions contiennent, en outre, du nitrate à la concentration 0,4 M, les autres conditions étant identiques. 10 cm³ de solution-tampon contenant 2,5 % d'asparagine sont ensuite ajoutés pour la mesure. Ces solutions sont telles que la composition finale des mélanges soit celle des conditions habituelles de la mesure : 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon PB3 et 1,66 % d'asparagine. La durée de la réaction est de 21 heures à 49°; les résultats sont exprimés en cm³ d'ammonium N/25.

L'effet dépressif du nitrate a été observé pour l'ensemble des sols étudiés (fig. XXXVI). Après un séjour des sols à 40° dans une solution de nitrate de potassium à la concentration 0,4M, il ne subsiste qu'une très faible proportion de l'activité de l'asparaginase, à l'exception du sol FM pour lequel 34,6 % de l'activité initiale sont conservés. Dans le but de déterminer si l'activité de l'asparaginase pouvait être complètement supprimée par action du nitrate, et, par suite, si l'hypothèse de la localisation de l'asparaginase dans les cellules pouvait être étendue à la totalité de cette enzyme, le traitement préalable des sols a été effectué avec des solutions de nitrate plus concentrées et à température plus élevée. Les résultats rapportés au tableau 35 montrent que l'action du nitrate ne progresse pratiquement plus à 49°, au-delà de la concentration 0,25M, pour les sols FV, MA, PR et FT; la disparition de l'activité de l'asparaginase est alors vraisemblablement complète. Pour les échantillons FP et surtout FM, l'augmentation de la concentration en nitrate au-delà de 0,25M s'accompagne d'une diminution supplémentaire de l'activité enzymatique. La disparition complète de celle-ci nécessiterait donc dans ces deux cas un traitement plus énergique que pour les autres sols.

Sols	Tampon	Concentration en nitrate dans les 5 cm³ de solution initiale				Différence entre les résultats extrêmes
		0,25M	0,5M	M	2M	
FP	PB2	2,12	1,90	1,66	1,58	0,54
	PB3	2,37	2,20	2,09	1,86	0,51
FM	PB2	2,93	2,43	1,97	1,63	1,30
	PB3	3,37	2,72	2,33	1,91	1,46
FV	PB2	1,62	1,58	1,53	1,36	0,26
	PB3	1,89	1,83	1,72	1,64	0,25
MA	PB2	1,57	1,54	1,53	1,41	0,16
	PB3	1,80	1,77	1,74	1,66	0,14
PR	PB2	1,10	1,05	0,97	0,86	0,24
	PB3	1,33	1,25	1,19	1,10	0,23
FT	PB2	0,91	0,89	0,89	0,78	0,13
	PB3	1,09	1,04	1,00	0,97	0,12

Tableau 35. — *Influence du traitement du sol par le nitrate, sur l'activité de l'asparaginase.* 3 g de sol FP, FM ou FV, ou 5 g de sol MA, PR ou FT, sont mélangés avec 5 cm³ de solution de nitrate de potassium de concentration 0,25M, 0,5M, M ou 2M, puis maintenus pendant 30 minutes à 49°. 10 cm³ de solution-tampon PB2 ou PB3 contenant 2,5 % d'asparagine sont ajoutés pour la mesure. La durée de la réaction est de 21 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25; les valeurs-témoins n'ont pas été déduites.

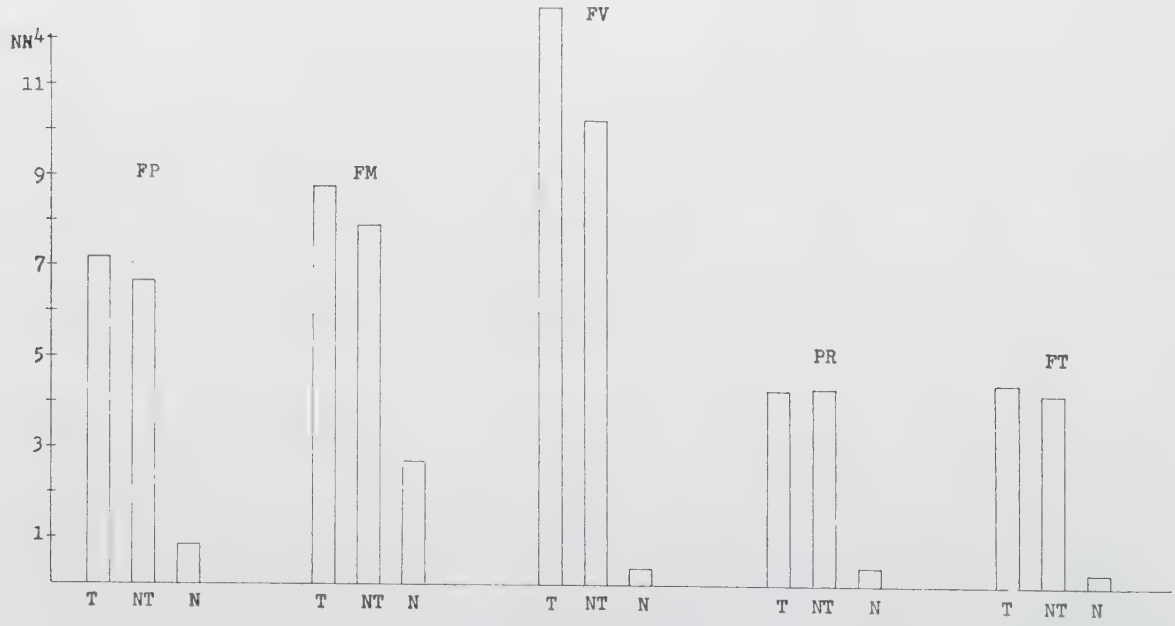


Fig. XXXVI. — INFLUENCE DU TRAITEMENT DES SOLS PAR LE NITRATE, SUR L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE

3 g de sol FP, FM ou FV, ou 5 g de sol PR ou FT, + 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon PB3, 1,66 % d'asparagine et du nitrate à la concentration 0,133 M. 21 heures à 49°; les résultats sont exprimés en cm³ d'ammonium N/25.

N - Le sol est préalablement maintenu pendant 30 minutes à 40°, dans 5 cm³ de solution de nitrate de potassium à la concentration 0,4 M; 10 cm³ de solution-tampon PB3 contenant 2,5 % d'asparagine sont ajoutés pour la mesure.

NT - Témoin sans traitement préalable. Le sol est mis directement dans les 15 cm³ de solution.

T - Témoin sans traitement préalable et sans nitrate. Le sol est mis directement dans 15 cm³ de solution contenant seulement l'asparagine et le tampon.

Les quantités d'ammonium obtenues avec les sols préalablement maintenus pendant 30 minutes à 49° dans une solution de nitrate à la concentration 2M, ont été comparées aux valeurs des témoins réalisés à différents pH avec les sols autoclavés (fig. XXXVII). A l'exception du sol FM, les valeurs des témoins et celles des mesures effectuées avec les sols traités par le nitrate, se situent sur une même courbe. Le nitrate a donc provoqué la disparition complète de l'activité de l'asparaginase. Pour le sol FM, les valeurs obtenues dans les deux cas sont distinctes mais voisines. L'activité de l'asparaginase de ce sol s'étant montrée très résistante à l'action du nitrate, lors des différents traitements, il est vraisemblable que l'effet de ce corps soit ici encore incomplet. On peut donc considérer que, pour tous les sols étudiés, l'hypothèse de la liaison de l'enzyme aux structures cellulaires intéresse la totalité de l'asparaginase des sols.

L'influence du nitrate sur l'activité de l'asparaginase A est analogue à celle qui est observée pour l'asparaginase B (fig. XXXVIII, XXXIX et XL). De même que lors du traitement thermique, les deux enzymes se différencient par l'effet protecteur du substrat. Celui-ci est nul pour l'asparaginase A; il est important, tout au moins aux faibles concentrations en nitrate, pour l'asparaginase B. La présence dans les sols de deux asparaginases mises en évidence par l'influence du borate sur l'activité enzymatique est donc confirmée par le comportement différent des deux enzymes, d'une part, lors du traitement thermique, et d'autre part, lors du traitement du sol par le nitrate.

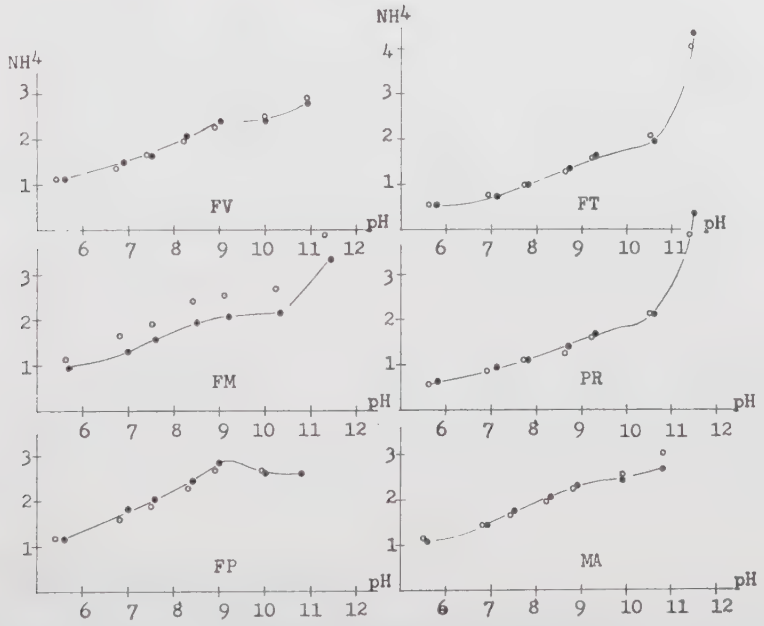


Fig. XXXVII. — INFLUENCE COMPARÉE DES TRAITEMENTS DES SOLS PAR LE NITRATE ET PAR LA CHALEUR SUR L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE

3 g de sol FP, FM ou FV, ou 5 g de sol MA, PR ou FT, + 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon PB1 à PB6 et 1,66 % d'asparagine. 21 heures à 49°. Dans le cas du traitement par le nitrate, la solution contient, en outre, du nitrate de potassium à la concentration 0,666 M. Les résultats sont exprimés en cm³ d'ammonium N/25.

• Le sol est préalablement maintenu pendant 30 minutes à 100° dans un autoclave. 5 cm³ d'eau et 10 cm³ de solution-tampon PB, contenant 2,5 % d'asparagine, sont ajoutés pour la mesure.

o Le sol est préalablement maintenu pendant 30 minutes à 49° dans 5 cm³ de solution de nitrate de potassium à la concentration 2 M. 10 cm³, de solution-tampon PB contenant 2,5 % d'asparagine sont ajoutés pour la mesure.

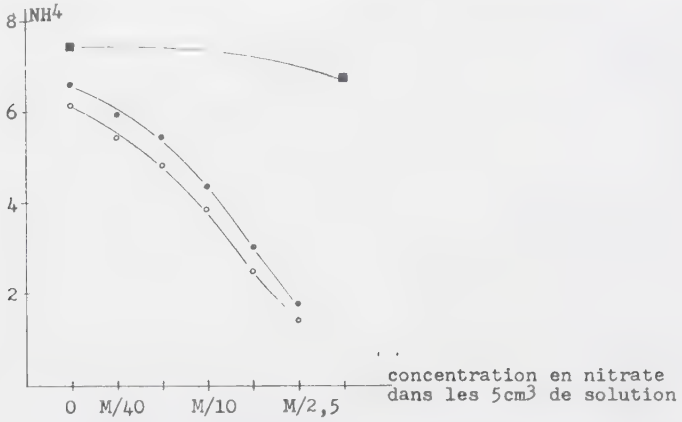


Fig. XXXVIII. — ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE A, MESURÉE APRÈS TRAITEMENT DU SOL FP, PENDANT 30 MINUTES A 40°, EN PRÉSENCE OU ABSENCE DE SUBSTRAT, DANS LES SOLUTIONS CONTENANT DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE NITRATE DE POTASSIUM.

3 g de sol + 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon PB6 ou PAs6, 1,66 % d'asparagine et différentes concentrations de nitrate de potassium. 21 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25; ils correspondent à la différence entre les mesures effectuées en présence de tampon PAs6 et les mesures homologues effectuées en présence de tampon PB6.

o Traitement préalable effectué sur 3 g de sol, dans 5 cm³ d'eau ou de solution de nitrate de potassium; 10 cm³ de solution-tampon contenant 2,5 % d'asparagine, sont ajoutés pour la mesure.

• Traitement préalable effectué sur 3 g de sol, dans 5 cm³ de solution d'asparagine à 2 % ou de solution de nitrate de potassium contenant 2 % d'asparagine; 10 cm³ de solution-tampon contenant 1,5 % d'asparagine, sont ajoutés pour la mesure.

■ Témoin. Le sol est mis directement dans les 15 cm³ de solution.

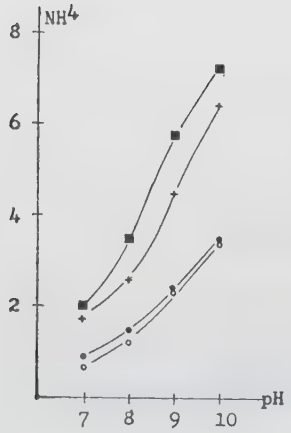


Fig. XXXIX. — INFLUENCE DU TRAITEMENT DU SOL FP PAR LE NITRATE SUR L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE A

3 g de sol + 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon PAs1 à PAs6 ou PB1 à PB6 et 1,66 % d'asparagine. 21 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25; ils correspondent à la différence, pour une même valeur pH, entre les mesures effectuées en présence de tampon PAs et les mesures homologues effectuées en présence de tampon PB.

o Le traitement préalable est effectué sur 3 g de sol, maintenus pendant 30 minutes à 25°, dans 5 cm³ de solution de nitrate de potassium à la concentration M; 10 cm³ de solution-tampon contenant 2,5 % d'asparagine, sont ajoutés pour la mesure.

• Le traitement préalable est effectué sur 3 g de sol, maintenus pendant 30 minutes à 25°, dans 5 cm³ de solution de nitrate de potassium à la concentration M, contenant 2 % d'asparagine; 10 cm³ de solution-tampon contenant 1,5 % d'asparagine sont ajoutés pour la mesure.

+ Témoin sans traitement préalable. Le sol est mis directement dans les 15 cm³ de solution.

■ Témoin sans traitement préalable et sans nitrate. Le sol est mis directement dans les 15 cm³ de solution contenant seulement le tampon et l'asparagine.

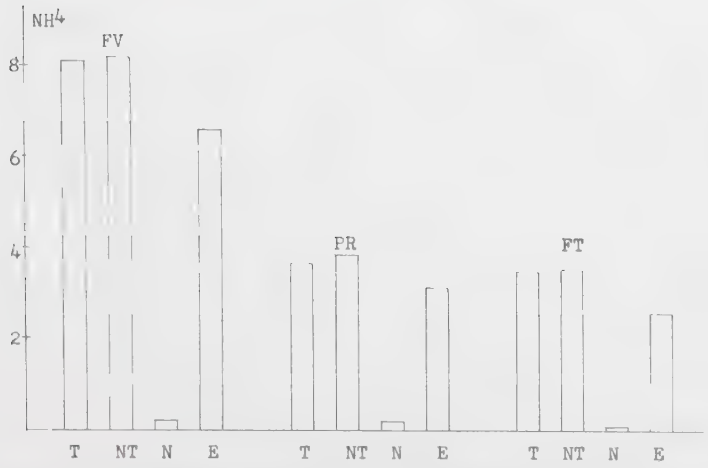


Fig. XL. — INFLUENCE DU TRAITEMENT DES SOLS PAR LE NITRATE, SUR L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE A

3 g de sol FV ou 5 g de sol PR ou FT + 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon PAs6 ou PB6, 1,66 % d'asparagine et du nitrate de potassium à la concentration 0,133 M. 21 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25; ils correspondent à la différence entre les mesures effectuées en présence de tampon PAs6 et les mesures homologues effectuées en présence de tampon PB6.

N - Le sol est préalablement maintenu pendant 30 minutes à 40° dans 5 cm³ de solution de nitrate de potassium à la concentration 0,4 M; 10 cm³ de solution-tampon contenant 2,5 % d'asparagine, sont ajoutés pour la mesure.

NT - Témoin sans traitement préalable. Le sol est mis directement dans les 15 cm³ de solution.

T - Témoin sans traitement préalable et sans nitrate. Le sol est mis directement dans 15 cm³ de solution contenant seulement l'asparagine et le tampon.

E - Traitement préalable effectué en l'absence de nitrate. Le sol est maintenu pendant 30 minutes à 40°, dans 5 cm³ d'eau; 10 cm³ de solution-tampon contenant 2,5 % d'asparagine, sont ajoutés pour la mesure.

Asparaginase des cellules de levure.

L'étude de l'élution de l'asparaginase des sols et l'étude de l'influence du nitrate et des traitements thermiques sur l'activité de l'enzyme, permettent de présumer que l'asparaginase des sols est localisée dans les cellules des microorganismes. Une similitude de comportement entre l'activité enzymatique du sol et celle des cellules de microorganismes contribuerait à consolider cette notion. L'étude comparative de l'activité de l'asparaginase de levure de boulangerie a été effectuée dans ce but.

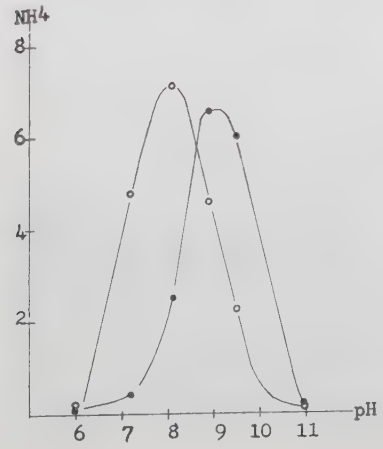


Fig. XLI. — INFLUENCE DU TOLUÈNE SUR L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE DES CELLULES DE LEVURE, EN PRÉSENCE DE BORATE

2 cm³ de suspension de levure (préparée par mélange de 5 g de levure fraîche de boulangerie et 100 cm³ d'eau), + 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon PB1 à PB6 et 1,66 % d'asparagine. 21 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

o Toluène : 1 cm³ ajouté à la solution avant l'addition de la suspension de levure.

• Sans toluène.

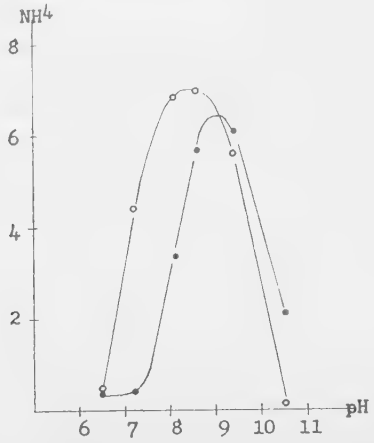


Fig. XLII. — INFLUENCE DU TOLUÈNE SUR L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE DES CELLULES DE LEVURE, EN L'ABSENCE DE BORATE

2 cm³ de suspension de levure (préparée par mélange de 5 g de levure fraîche de boulangerie et 100 cm³ d'eau), + 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon P1 à P6 et 1,66 % d'asparagine. 21 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

○ Toluène : 1 cm³ ajouté à la solution avant l'addition de la suspension de levure.

• Sans toluène.

L'activité de l'asparaginase des cellules de levure fraîche est fortement affectée par le toluène. Avec la solution tampon-phosphate-borate, celui-ci décale d'une unité vers l'acidité la courbe d'activité en fonction du pH (fig. XLI). En l'absence de borate, il provoque un élargissement de la courbe, laquelle englobe alors celles qui correspondent aux mesures effectuées avec et sans toluène, dans les solutions boriques (fig. XLII). Ces résultats pourraient traduire, d'une part, la présence dans la levure des deux asparaginases A et B mises en évidence dans les sols et, d'autre part, une modification de l'accessibilité de l'enzyme au substrat sous l'influence du pH et du toluène. Ainsi, dans les milieux renfermant les solutions-tampon-phosphate ou phosphate-borate, l'accessibilité de l'asparaginase serait très réduite au-dessous de pH 7,5 puis augmenterait progressivement jusqu'à pH 9,0. En présence de toluène, l'accessibilité serait accrue dans toute la zone pH d'activité. Ceci entraînerait une augmentation de la production d'ammonium dans la partie de la courbe voisine de la neutralité; il en résulterait en outre une inhibition de l'asparaginase A par le borate aux pH élevés auxquels cette enzyme est active.

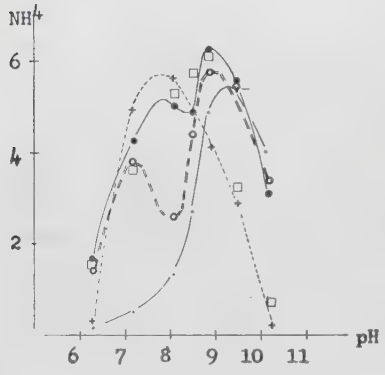


Fig. XLIII. — INFLUENCE DU FLUORURE SUR L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE DES CELLULES DE LEVURE

2 cm³ de suspension de levure (préparée par mélange de 5 g de levure fraîche de boulangerie et 100 cm³ d'eau), + 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon PB, du fluorure de sodium à différentes concentrations et 1,66 % d'asparagine. 21 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

○ Concentration en fluorure : M/6.

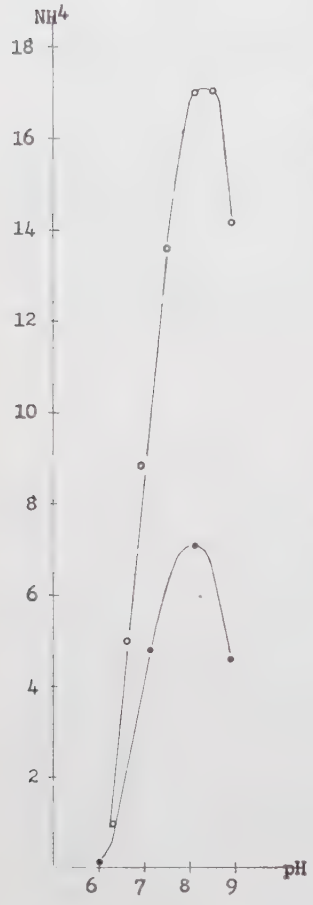
● — — : M/3.

□ — — : 2M/3.

• Témoin sans fluorure.

+ Témoin sans fluorure, mais présence de 1 cm³ de toluène par tube.

L'activité enzymatique de la levure, aux pH compris entre les valeurs 6,5 et 9,0, peut également être accrue par le fluorure (fig. XLIII). A la concentration M/6, le fluorure n'est pleinement efficace qu'aux pH inférieurs à la valeur 7,0, ce qui se traduit par la présence de deux sommets sur la courbe d'activité. A la concentration M/3 en fluorure, les deux sommets tendent à se rejoindre; au-dessous de pH 8,5 l'activité de l'asparaginase est alors voisine de celle qui est observée en présence de toluène. A la concentration 2M/3 en fluorure et au-delà de pH 9,0, on observe un effet dépressif qui résulte vraisemblablement de l'inhibition de l'asparaginase A par le borate. L'influence du fluorure est donc très voisine de celle du toluène, elle réside probablement aussi dans un accroissement de l'accessibilité de l'enzyme au substrat et au borate. L'action du fluorure s'étend progressivement vers la partie basique de la zone pH d'activité de l'asparaginase, lorsque sa concentration croît.



Cette interprétation des effets du pH, du toluène et du fluorure sur l'activité enzymatique des cellules de levure, est corroborée par le fait que le pH optimum d'activité de l'asparaginase purifiée extraite de la levure, est identique au pH optimum d'activité des cellules de levure, en présence de toluène (fig. XLIV). D'après J. Leibowitz et S. Hestrin (73), l'activité des cellules serait limitée, non seulement par la perméabilité cellulaire, mais aussi par des facteurs de régulation des potentialités métaboliques de la cellule. En permettant à l'asparaginase de réagir avec le substrat, dans des conditions où la présence de cette enzyme dans les cellules est masquée, le toluène et le fluorure seraient donc intervenus soit sur la perméabilité cellulaire, soit sur des facteurs de régulation.

Fig. XLIV. — ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE DE LEVURE, PURIFIÉE

○ 5 cm³ de solution d'asparaginase + 10 cm³ de solution-tampon PB, contenant 2 % d'asparagine. 4 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

• Mesures comparatives effectuées avec la levure fraîche, en présence de toluène (Résultats rapportés à la figure XLI).

Dans les deux cas, leur action est également intéressante car elle devrait permettre de rechercher des critères de la localisation de l'asparaginase dans les cellules. En effet, un traitement des cellules qui provoquerait une diminution de leur activité enzymatique mesurée en l'absence de fluorure ou de toluène, mais ne modifierait pas l'activité enzymatique mesurée en présence de l'un de ces deux corps, aurait affecté non pas l'enzyme elle-même, mais son accessibilité au substrat. L'influence de ce traitement serait donc en relation avec le fait que l'enzyme est incluse dans des cellules.

Dans le sol, l'influence du nitrate sur l'activité de l'asparaginase a été considérée comme une modification de l'accessibilité de l'enzyme. Si le nitrate affecte également l'activité enzymatique de la levure conformément aux conditions qui viennent d'être définies, l'influence du nitrate pourrait alors être retenue comme critère de la localisation de l'asparaginase dans les cellules. L'expérience suivante a été réalisée: la levure est mise en suspension dans une solution de nitrate de potassium à la concentration 0,4M; une fraction de la suspension est ensuite maintenue pendant 30 minutes à 49°. Les mesures sont effectuées avec et sans toluène, d'une part, sur la fraction traitée à 49° et, d'autre part,

sur la fraction non traitée. Les résultats sont rapportés à la figure XLV. En l'absence de toluène on observe une diminution importante de l'activité enzymatique des cellules de levure simplement mises en suspension dans une solution de nitrate, à la température du laboratoire; le traitement

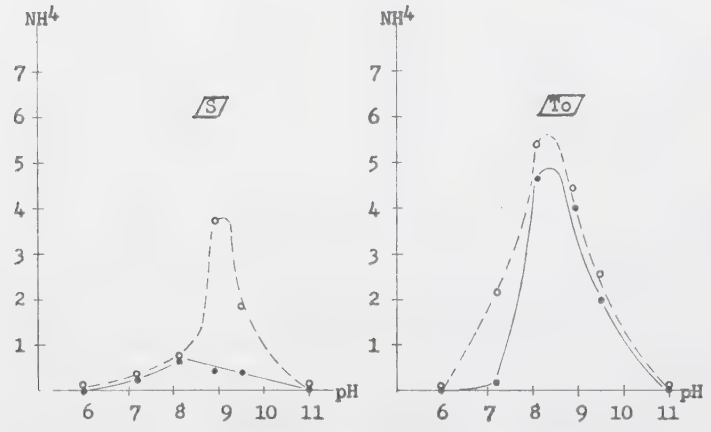


Fig. XLV. — INFLUENCE DU TRAITEMENT DE LA LEVURE PAR LE NITRATE, SUR L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE

S

o 2 cm³ de suspension de levure (préparée par mélange de 5 g de levure fraîche de boulangerie et 100 cm³ de solution de nitrate de potassium 0,4 M) + 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon PB1 à PB6 et 1,66 % d'asparagine. 21 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

• La suspension de levure dans la solution de nitrate, est préalablement maintenue pendant 30 minutes à 49°.

To

Même expérience; mais 1 cm³ de toluène est ajouté aux 15 cm³ de solution, avant l'addition de la suspension de levure.

ultérieur de 30 minutes à 49° amène la disparition presque totale de l'activité enzymatique. Par contre, l'activité de l'asparaginase des cellules de levure mesurée en présence de toluène n'est que légèrement diminuée par ce traitement. Celui-ci n'affecte donc pas l'enzyme, il intervient sur la perméabilité cellulaire ou les facteurs de régulation. Il en résulte que la disparition de l'activité de l'asparaginase par action du nitrate constitue un critère de la liaison de cette enzyme aux structures des microorganismes. L'activité de l'asparaginase du sol pouvant être totalement supprimée par action du nitrate il est possible de conclure que cette enzyme est localisée dans les cellules des microorganismes.

Des différences se présentent cependant entre le comportement de l'asparaginase des sols et celui de l'asparaginase des cellules de levure. Ainsi dans les sols le fluorure n'a pratiquement aucune influence sur l'activité de l'asparaginase, quant au toluène, il a un léger effet dépressif (fig. XLVI). Toutefois la courbe d'activité enzymatique des sols en fonction du pH est semblable à celle qui est obtenue avec les cellules de levure, en présence de toluène: ainsi, l'asparaginase du sol est très active au-dessous de pH 7,5, en outre, le borate a un effet dépressif en milieu basique. L'asparaginase du sol est donc plus accessible au substrat et au borate que ne l'est l'asparaginase des cellules de levure.

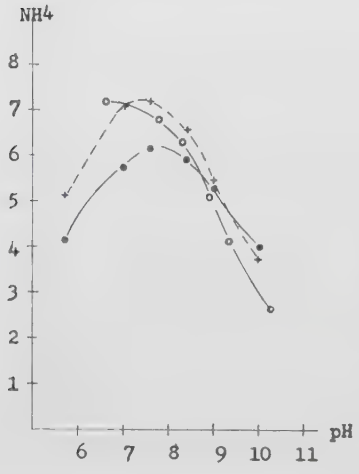


Fig. XLVI. — INFLUENCE DU FLUORURE ET DU TOLUÈNE, SUR L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE DU SOL

+ : 3 g de sol FP, + 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon PB1 à PB6 et 1,66 % d'asparagine. 21 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

○ : Présence de 2 cm³ de toluène, avec lesquels le sol est resté en contact préalablement, pendant 50 minutes.

• : Les 15 cm³ de solution renferment du fluorure de sodium à la concentration M/3.

Fig. XLVII. — INFLUENCE DU KAOLIN, SUR L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE DES CELLULES DE LEVURE

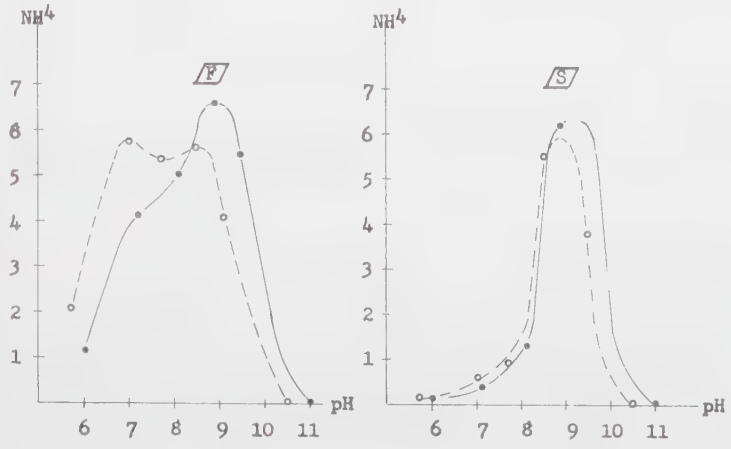
S

● — 2 cm³ de suspension de levure (préparée par mélange de 5 g de levure fraîche de boulangerie et 100 cm³ d'eau), + 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon PB1 à PB6 et 1,66 % d'asparagine. 21 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

o — 4 g de kaolin sont mélangés avec les 15 cm³ de solution, avant l'addition de la suspension de levure.

F

Même expérience; mais les 15 cm³ de solution renferment du fluorure de sodium à la concentration M/3.



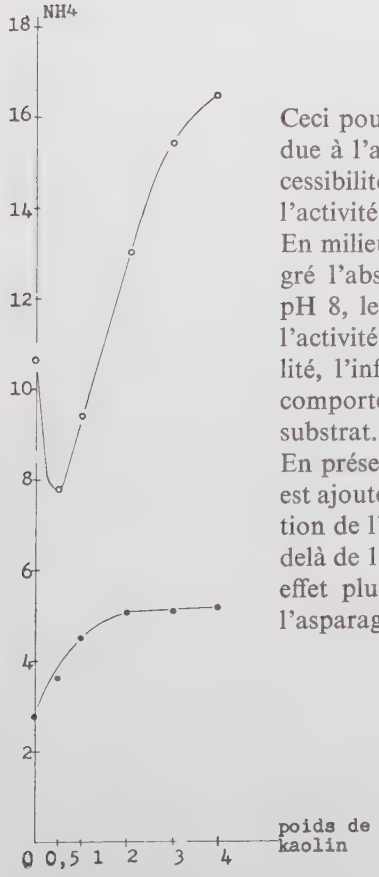


Fig. XLVIII. — INFLUENCE DU KAOLIN SUR L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE DES CELLULES DE LEVURE, EN PRÉSENCE DE TOLUÈNE

Ceci pourrait résulter d'une plus grande perméabilité cellulaire dans le sol, due à l'adsorption des cellules. Une telle influence de l'adsorption sur l'accessibilité de l'enzyme peut être mise en évidence en effectuant la mesure de l'activité de l'asparaginase des cellules de levure, en présence de kaolin. En milieu basique on observe alors une inhibition de l'asparaginase A malgré l'absence de fluorure ou de toluène (fig. XLVII/S). Entre pH 6 et pH 8, le kaolin provoque, en présence de fluorure, une augmentation de l'activité des cellules de levure (fig. XLVII/F). Au voisinage de la neutralité, l'influence du kaolin se manifeste donc seulement lorsque le milieu comporte un autre facteur d'accroissement de l'accessibilité de l'enzyme au substrat. Cet autre facteur peut également être le toluène (fig. XLVIII). En présence de toluène le kaolin a cependant un effet dépressif lorsqu'il est ajouté en faible quantité. Ceci pourrait être dû à la libération d'une fraction de l'asparaginase des cellules, puis à son adsorption sur le kaolin. Au-delà de 1,5 g de kaolin l'augmentation de la perméabilité cellulaire aurait un effet plus important que la diminution d'activité due à l'adsorption de l'asparaginase libérée.

● 10 cm³ de suspension de levure (obtenue en mélangeant 2 g de levure fraîche de boulangerie avec 100 cm³ d'eau), sont mélangés avec des quantités variables de kaolin. Les suspensions sont agitées mécaniquement pendant 15 minutes, puis on leur ajoute 5 cm³ de solution-tampon 2PB3 (concentration double du tampon PB3), contenant 4 % d'asparagine. 21 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

o 0,5 cm³ de toluène sont ajoutés dans le milieu avant l'agitation mécanique.

troisième partie

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE DANS LES SOLS HUMIDIFIÉS, MAINTENUS A 30° ET ENRICHIS OU NON EN CELLULOSE

Dans la plupart des études consacrées aux enzymes du sol, l'activité enzymatique est considérée dans ses rapports avec l'activité biologique telle qu'elle est évaluée par les mesures de respiration ou de densité des microorganismes. Un certain parallélisme a été mis en évidence, au moins dans le cas des mesures effectuées en fonction de la profondeur des prélèvements. Par contre, il a été rapporté des mesures échelonnées au cours de l'année, qui traduisent une absence de corrélation. La spécificité des enzymes est considérée par quelques auteurs comme la cause de cette situation; il serait par suite nécessaire de déterminer l'activité de plusieurs enzymes. Cependant lors de la dégradation d'une substance dans le sol, de multiples activités microbiennes interviennent dans les chaînons successifs de transformation. Il devrait donc être possible de provoquer l'intensification d'une activité enzymatique sans qu'il soit nécessaire d'ajouter directement au sol le substrat correspondant. On peut ainsi concevoir que la mesure d'une activité enzymatique donnée soit le reflet de processus biologiques impliqués de façon plus ou moins immédiate dans la dégradation de la substance utilisée.

Dans le but de mettre en évidence une telle relation entre l'asparaginase et l'activité des microorganismes dans le sol, nous avons procédé à l'incubation d'échantillons enrichis en cellulose. Le choix de la cellulose résulte de considérations d'ordre écologique. Cette substance est naturellement introduite dans le sol en grande quantité, son addition ne devrait donc pas amener de perturbation trop artificielle des équilibres biologiques.

VI. — INFLUENCE DE LA DURÉE DE L'INCUBATION ET DE LA QUANTITÉ DE CELLULOSE AJOUTÉE AU SOL, SUR L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE

Méthode ; Incubation des sols, mesure de la production de gaz carbonique.

200 g ou 300 g de terre enrichie en cellulose et un échantillon témoin non enrichi sont humidifiés puis placés dans des fioles de Roux; celles-ci sont ensuite maintenues à 30°. Les fioles ont une capacité de 1 litre; elles sont fermées par un bouchon de caoutchouc comportant un tuyau muni d'une pince de Mohr. L'eau nécessaire à l'humectation du sol est déterminée expérimentalement, c'est la quantité d'eau qui demeure dans le sol après lessivage puis essorage sur entonnoir de Buchner, sur vide. Périodiquement on effectue des prélèvements de terre dans la fiole pour la mesure de l'activité de l'asparaginase. La terre prélevée est séchée en boîte de Pétri ouverte, sous ventilateur,

à la température du laboratoire. On effectue également des prélèvements périodiques de l'atmosphère de la fiole pour suivre comparativement à la mesure enzymatique, l'activité biologique évaluée par la mesure de la production de gaz carbonique. Pour cela la pression est ramenée, au moyen d'une pompe à vide, à 2 ou 3 mm de mercure dans une fiole d'Erlenmeyer de 100 cm³ munie d'un robinet et contenant 10 cm³ de solution de baryte environ N/10; la fiole d'Erlenmeyer est ensuite abouchée avec la fiole de Roux et les deux récipients sont mis en communication pendant quelques secondes. La fiole d'Erlenmeyer est fermée puis agitée énergiquement pour permettre la fixation du gaz carbonique par la baryte, celle-ci est ensuite titrée en retour par l'acide oxalique N/10 en présence de phénolphtaléine. Après chaque prélèvement gazeux on fait circuler pendant une minute un courant d'air saturé d'eau dans la fiole de Roux pour en renouveler l'atmosphère.
Soient :

P : le poids, en grammes de terre sèche contenue initialement dans la fiole de Roux.

p : la quantité totale en grammes de terre humide prélevée depuis le début de l'expérience.

h : le rapport eau/sol sec dans la terre humide.

d : la densité absolue du sol (voisine de 2,6).

Vf : le volume en cm³ de la fiole de Roux.

Ve : le volume de la phase gazeuse dans la fiole d'Erlenmeyer, contenant la solution de baryte : volume de la fiole d'Erlenmeyer moins le volume de la solution de baryte.

$x1$: le nombre de cm³ d'acide oxalique N/10 utilisés pour neutraliser 10 cm³ de solution de baryte environ N/10.

$x2$: le nombre de cm³ d'acide oxalique N/10 utilisés pour titrer en retour la solution de baryte.

H : le nombre d'heures écoulées depuis la mesure précédente.

1 cm³ d'acide oxalique N/10 correspondant à 2,2 mg de CO^2, la quantité de gaz carbonique, en mg par 24 heures, rapportée à 5 g de terre sèche est donnée par l'équation suivante :

$$\text{Poids de } CO^2 = \frac{\text{Volume gazeux total}}{\text{Volume gazeux de l'ampoule}} \quad \frac{5}{\text{poids, en g, de terre sèche}} \quad \frac{24}{H} \quad (2,2)(x1 - x2)$$

soit :

$$\text{poids de } CO^2 = K1\left(\frac{K2 + p}{K3 - p}\right)\left(\frac{x1 - x2}{H}\right) mg$$

$$K1 = \frac{264(1/d + h)}{Ve} \qquad K2 = \left(\frac{Vf + Ve}{1/d + h} - P\right)(1 + h) \qquad K3 = P(1 + h)$$

Par cette méthode on évalue la quantité d'anhydride carbonique présent dans l'atmosphère de la fiole de Roux. Or cette quantité ne dépend pas seulement de l'intensité de l'activité biologique du sol, mais également d'un équilibre entre la pression de gaz carbonique et la concentration en bicarbonate dans la phase aqueuse (106). Dans les fioles de Roux les volumes des phases aqueuse et gazeuse sont voisins respectivement de 40 et 1 000 cm³; dans ces conditions le rapport entre, d'une part, les quantités de bicarbonate dissous dans l'eau imbibant le sol et, d'autre part, la quantité de gaz carbonique présent dans l'atmosphère de la fiole, lorsque l'équilibre est établi, est proche

de 1 à *p*H 7,8, de 0,26 à *p*H 7,4 et de 0,1 à *p*H 7,0; il est pratiquement nul à *p*H 5,0. L'évaluation de la production de gaz carbonique est d'autant plus précise que ce rapport est plus faible, donc que le *p*H du sol est plus bas. A *p*H 7,4 l'erreur est de 26 %; cependant, lorsque l'on considère l'allure de la courbe de production de gaz carbonique dans le temps, comparativement à celle de l'activité enzymatique, la méthode est encore acceptable à ce *p*H.

La cellulose ajoutée au sol dans cette première série de mesures, est obtenue en broyant dans un mortier, du coton hydrophile préalablement exposé pendant quelques minutes aux vapeurs d'acide chlorhydrique. Pour cela le coton est placé en couche mince au-dessus d'un récipient contenant de l'acide chlorhydrique maintenu à l'ébullition. Après broyage le coton est lavé abondamment à l'eau du robinet puis à l'eau distillée jusqu'à ce que les eaux de lavage ne soient plus acides. Il est ensuite séché à l'étuve puis tamisé pour éliminer les fractions supérieures à 0,2 mm. Les expériences suivantes ont été conduites avec de la cellulose en poudre pour chromatographie.

Résultats :

Les mesures ont été effectuées sur cinq sols des environs de Tananarive; les résultats obtenus sont rapportés aux figures XLIX, L, LI, LII, LIII et LIV. De l'examen de ces figures il ressort que :

a) L'incubation d'un sol simplement humidifié n'affecte pas sensiblement l'activité de l'asparaginase.

b) Dans les sols enrichis en cellulose, une augmentation de l'activité de l'asparaginase peut se produire. Elle est très nette pour les sols βJA et βSB et peu accusée pour le sol βSA. Quant aux sols βPR et βMA, leur activité enzymatique n'est pas affectée par l'addition de cellulose, même après 40 jours d'incubation.

c) Dans les sols où l'activité de l'asparaginase est accrue par la présence de cellulose, celle-ci a un effet d'autant plus grand que la quantité de cellulose ajoutée est plus faible, entre les valeurs 0,5 % et 5 %. Les proportions de cellulose additionnée au sol étaient 0,5 %, 1,25 %, 2,5 %, 3,75 % et 5 %; seules les courbes correspondant aux valeurs 0,5 %, 2,5 % et 5 % ont été représentées pour ne pas surcharger les figures.

d) Lorsque l'activité de l'asparaginase est accrue par la présence de cellulose, la production de gaz carbonique est elle-même augmentée. Elle présente un maximum généralement compris entre les deuxième et quatrième jours, puis elle diminue mais demeure plus élevée que celle du témoin sans cellulose. Pour les additions de cellulose comprises entre 0,5 % et 5 % du poids de terre, la production de gaz carbonique est pratiquement indépendante de la quantité de cellulose ajoutée au sol, à l'exception du sol de marais βMA. De plus, dans ce sol, une augmentation de la production de gaz carbonique par rapport au témoin non enrichi en cellulose a lieu seulement à partir des 34e et 12e jours d'incubation, pour les additions respectives de 2,5 % et 5 % de cellulose; mais cette élévation tardive de la production de gaz carbonique n'est pas reflétée par l'activité de l'asparaginase.

e) L'addition complémentaire d'azote minéral au sol βJA enrichi en cellulose provoque une intensification du dégagement de gaz carbonique (fig. LIV). L'activité de l'asparaginase est par contre très peu affectée par cet apport d'azote.

f) La corrélation observée entre la production de gaz carbonique et l'activité de l'asparaginase, lors des premiers jours d'incubation du sol βJA enrichi en cellulose, se manifeste également lorsque le sol est séché puis réhumecté en cours d'incubation (fig. LV). Il se produit alors, dès le premier jour qui suit la réhumectation, une augmentation simultanée de la production de gaz carbonique et de l'activité enzymatique, par rapport à l'échantillon maintenu contamment humide.

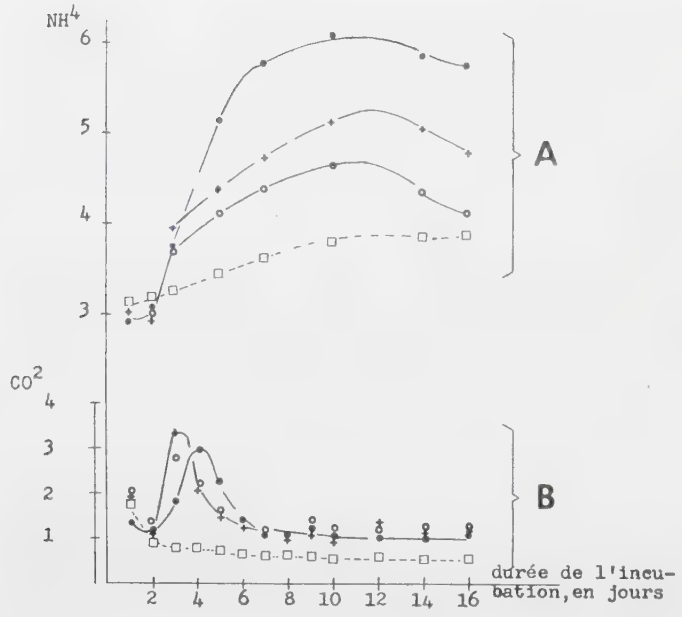


Fig. XLIX. — ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE ET DÉGAGEMENT DE GAZ CARBONIQUE DANS LE SOL βJA ENRICHI EN CELLULOSE ET MAINTENU HUMIDE A 30°

— La production de gaz carbonique est mesurée directement sur l'échantillon incubé; elle est exprimée en mg de CO^2 pour 5 g de sol.

— L'activité de l'asparaginase est mesurée sur le sol séché après différents temps d'incubation (5 g de sol sec sont mélangés avec 15 cm^3 de solution contenant 10 cm^3 de solution-tampon PB2 et 1,66 % d'asparagine, 21 heures à 49°); les résultats sont rapportés en cm^3 d'ammonium N/25.

A - Activité de l'asparaginase;
B - Dégagement de CO^2.

□ - Témoin sans cellulose.
● - Sol additionné de 0,5 % de cellulose.
+ - Sol additionné de 2,5 % de cellulose.
○ - Sol additionné de 5 % de cellulose.

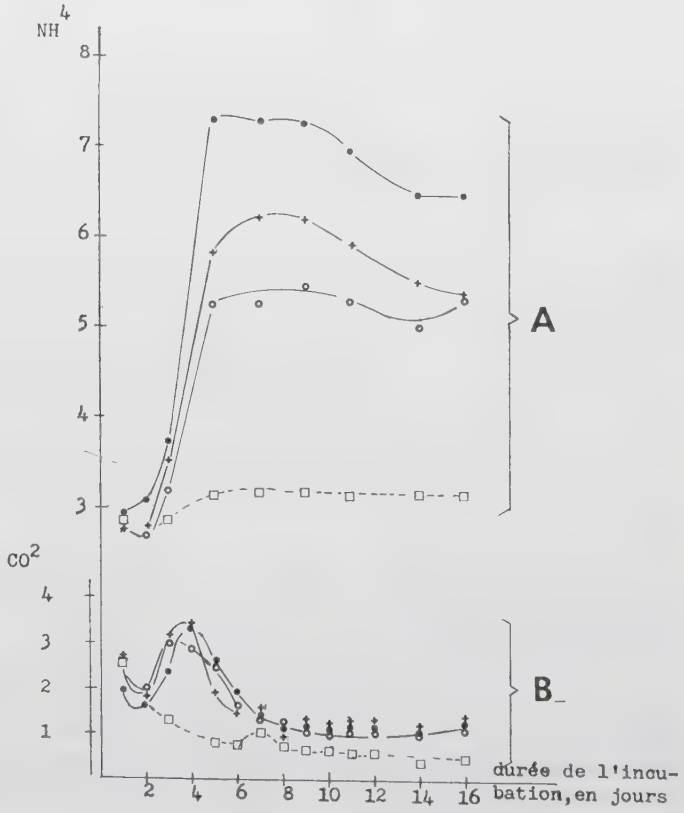


Fig. L. — ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE ET DÉGAGEMENT DE GAZ CARBONIQUE DANS LE SOL βSB ENRICHI EN CELLULOSE ET MAINTENU HUMIDE A 30°

— Mêmes conditions expérimentales qu'à la figure XLIX.

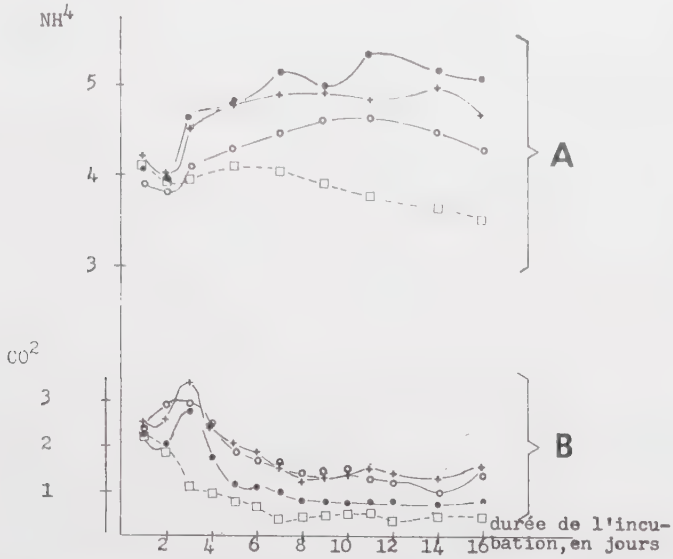


Fig. LI. — ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE ET DÉGAGEMENT DE GAZ CARBONIQUE DANS LE SOL βSA ENRICHI EN CELLULOSE ET MAINTENU HUMIDE A 30°

— Mêmes conditions expérimentales qu'à la figure XLIX.

Fig. LII. — ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE ET DÉGAGEMENT DE GAZ CARBONIQUE DANS LE SOL βPR ENRICHI EN CELLULOSE ET MAINTENU HUMIDE A 30°

— Mêmes conditions expérimentales qu'à la figure XLIX.

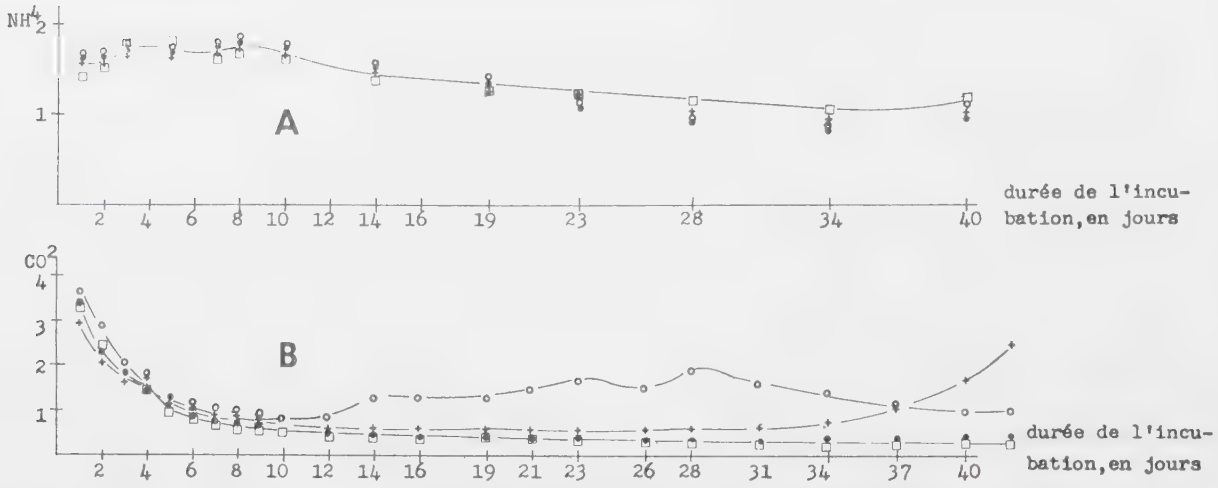


Fig. LIII. — ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE ET DÉGAGEMENT DE GAZ CARBONIQUE DANS LE SOL βMA ENRICHI EN CELLULOSE ET MAINTENU HUMIDE A 30°

— Mêmes conditions expérimentales qu'à la figure XLIX.

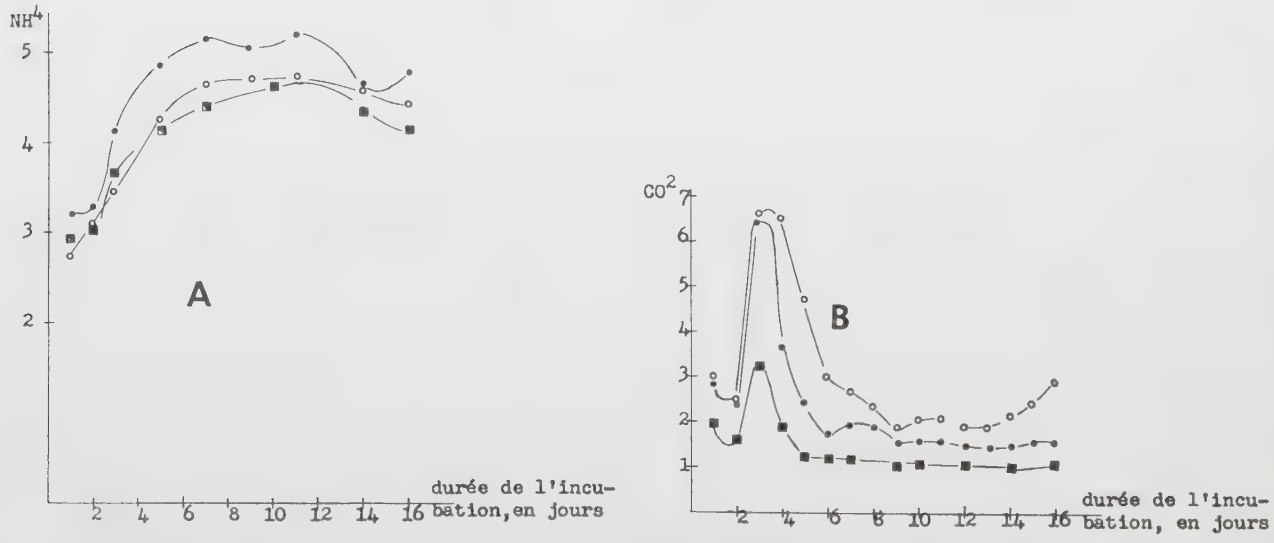


Fig. LIV. — ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE ET DÉGAGEMENT DE GAZ CARBONIQUE DANS LE SOL βJA ENRICHI EN CELLULOSE ET EN AZOTE MINÉRAL PUIS MAINTENU HUMIDE A 30°. LA CELLULOSE EST PARTOUT PRÉSENTE A LA DOSE DE 5 %; L'AZOTE EST AJOUTÉ EN QUANTITÉ VARIABLE, SOUS FORME DE SULFATE D'AMMONIUM

— La production de gaz carbonique est mesurée directement sur l'échantillon incubé; elle est exprimée en mg de CO^2 pour 5 g de sol.

— L'activité de l'asparaginase est mesurée sur le sol séché après différents temps d'incubation (5 g de sol sec sont mélangés avec 15 cm^3 de solution contenant 10 cm^3 de solution-tampon PB2 et 1,66 % d'asparagine, 21 heures à 49°); les résultats sont rapportés en cm^3 d'ammonium N/25.

A - Activité de l'asparaginase;

B - Dégagement de CO^2.

■ Témoin sans sulfate d'ammonium.

• Sol additionné d'une quantité de sulfate d'ammonium correspondant à 0,005 % de NH^3.

○ Sol additionné d'une quantité de sulfate d'ammonium correspondant à 0,01 % de NH^3.

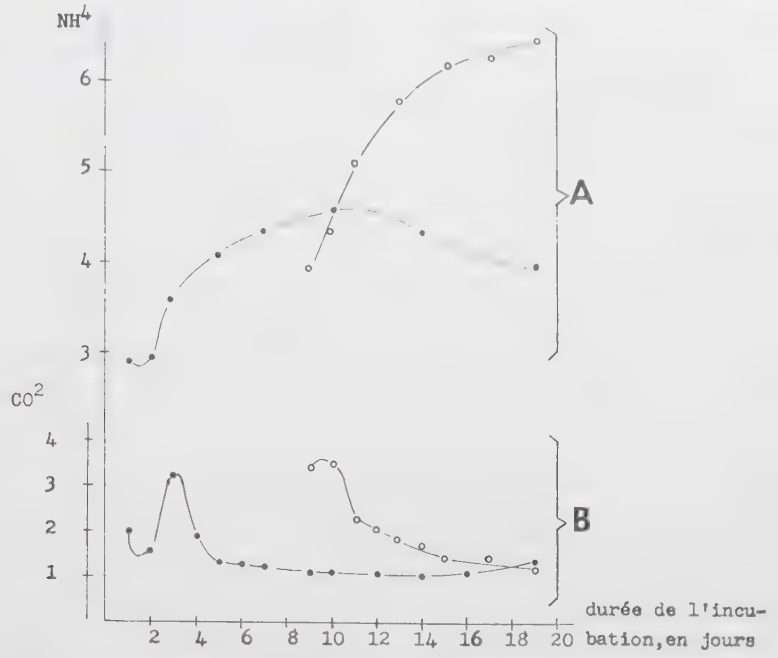


Fig. LV. — INFLUENCE DE LA DESSICATION PUIS DE LA RÉHUMECTATION SUR L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE ET LE DÉGAGEMENT DE GAZ CARBONIQUE DANS LE SOL βJA ADDITIONNÉ DE 5 % DE CELLULOSE ET MAINTENU A 30°

— La production de gaz carbonique est mesurée directement sur l'échantillon incubé; elle est exprimée en mg de CO^2 pour 5 g de sol.

— L'activité de l'asparaginase est mesurée sur le sol séché après différents temps d'incubation (5 g de sol sec sont mélangés avec 15 cm^3 de solution contenant 10 cm^3 de solution-tampon PB2 et 1,66 % d'asparagine, 21 heures à 49°); les résultats sont rapportés en cm^3 d'ammonium N/25.

A - Activité de l'asparaginase;
B - Dégagement de CO^3.
• Sol maintenu constamment humide.
○ Sol séché à l'air après 8 jours d'incubation, puis réhumecté.

VII. — RECHERCHE DES FACTEURS IMPLIQUÉS DANS LA RÉPONSE DE L'ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE A L'ADDITION DE CELLULOSE

Activité enzymatique de microorganismes appartenant à différents groupes physiologiques.

Les cultures de microorganismes sont obtenues sur des milieux électifs habituels et sur ces mêmes milieux additionnés d'humate de calcium, dans le but de rechercher l'influence éventuelle de cette substance sur l'activité enzymatique des microorganismes. L'humate calcique est préparé à partir de terreau. L'extraction est effectuée par une solution de pyrophosphate de concentration 0,1M, dans laquelle les acides humiques sont précipités par l'acide sulfurique puis centrifugés.

Les acides humiques sont ensuite dispersés par la potasse, floculés par l'acide sulfurique et les ions Ca apportés par du calcaire, puis centrifugés à nouveau. Ils sont alors repris par l'eau et amenés en milieu basique avec de la chaux. Les humates calciques obtenus par centrifugation à 10 000 g, se présentent sous forme d'un culot gélatineux qui est conservé dans un réfrigérateur. La quantité d'humate présent dans les milieux est exprimée en poids de cette substance.

Les milieux solides au gel de silice sont préparés à partir d'acide silicique obtenu en faisant passer à travers une colonne de permutite, une solution de silicate de sodium renfermant, par litre, 220 cm³ de solution du commerce de densité 1,33. L'acide silicique est mélangé avec un volume égal de milieu nutritif. La solidification du mélange intervient en moins d'une heure en présence de calcaire; elle est d'autant plus rapide que la concentration saline est plus élevée.

1. *Cellulolytiques :* Le parallélisme observé entre, d'une part, l'élévation de la production de gaz carbonique, indice du démarrage de l'attaque de la cellulose et, d'autre part, l'augmentation d'activité de l'asparaginase, oriente en premier lieu vers le groupe des cellulolytiques, la recherche des microorganismes responsables de cette activité enzymatique.

Sur des milieux solides au gel de silice renfermant 5 % de solution saline de Winogradsky, 1 % de calcaire et différentes quantités de nitrate de potassium (0, 0,025 %, 0,1 %, 0,4 % et 1,6 %) sont déposés des disques de cellulose de 9 mm de diamètre et 1 mm d'épaisseur. Ces disques s'imbibent du milieu minéral; on les saupoudre de terre. Dans une deuxième série de milieux les disques de cellulose sont préalablement imprégnés de 8,5 mg d'humate calcique, puis séchés. La colonisation des disques par les bactéries et les filaments mycéliens est d'autant plus rapide que le milieu est plus riche en azote. Aux 8e et 13e jours d'incubation on effectue une mesure d'activité enzymatique. Pour cela deux disques de cellulose colonisés sont immergés dans 15 cm³ de milieu contenant 10 cm³ de solution-tampon PB3 et 1,66 % d'asparagine, auxquels est ajouté 1 cm³ de toluène. Après 21 heures à 49° on procède à la distillation. Les témoins sont effectués avec des disques de cellulose préalablement maintenus pendant 20 minutes à 100°. L'activité de l'asparaginase exprimée en volume d'ammonium N/25 variait pour l'ensemble des traitements entre 0,16 et 0,36 cm³. D'autres mesures effectuées en l'absence de toluène, sur des cultures réalisées en milieu liquide, sont rapportées au tableau 36; les résultats sont compris entre 0,00 et 0,18 cm³ d'ammonium N/25. Ces valeurs peu élevées montrent que les microorganismes responsables de la dégradation

Quantité de nitrate dans le milieu de culture	Absence d'humus dans le milieu de culture	Présence de 1 % d'humate calcique dans le milieu de culture
%		
0	0,13	0,02
0,025	0,08	0,11
0,05	0,00	0,16
0,1	0,04	0,18
0,2	—	0,04

Tableau 36. — *Activité enzymatique de cultures de cellulolytiques.* Les cultures sont obtenues dans des milieux contenant 1 % de cellulose en poudre, 1 % de calcaire, 5 % de solution saline de Winogradsky, 0,02 % de terre et différentes quantités de nitrate de potassium; ces milieux renferment ou non de l'humus. 100 cm³ de milieu sont mis dans une fiole d'Erlenmeyer de 500 cm³; après 7 jours d'incubation à 30° on effectue une mesure de l'activité de l'asparaginase, Pour cela 5 cm³ de milieu sont mélangés avec 10 cm³ de solution-tampon PB3 contenant 2,5 % d'asparagine; après 21 heures à 49° on procède à la distillation. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

de la cellulose n'ont pas synthétisé d'asparaginase. Il est donc peu probable qu'ils soient directement responsables de l'augmentation d'activité de l'asparaginase observée dans certains sols après addition de cellulose.

Cette hypothèse est corroborée par le fait que l'augmentation d'activité de l'asparaginase n'est pas proportionnelle à la production de gaz carbonique, laquelle passe rapidement par un maximum puis diminue, alors que l'activité de l'asparaginase continue à s'élever (fig. XLIX, L et LV). On doit également signaler, en accord avec ceci, que l'activité de l'asparaginase est peu modifiée (fig. LIV) lorsque la cellulolyse est amplifiée par une addition complémentaire d'azote.

2. *Fixateurs de l'azote moléculaire :* A la cellulolyse fait normalement suite une activité fixatrice d'azote moléculaire qui se développe grâce aux produits d'hydrolyse de la cellulose. Ceci peut être facilement observé sur les milieux solides pour cellulolytiques, où les *Azotobacter* apparaissent sur le papier en voie de dégradation. Il est cependant peu probable que dans le sol enrichi en cellulose les fixateurs d'azote soient responsables de l'augmentation d'activité de l'asparaginase, car celle-ci débute en même temps que la cellulolyse.

Des mesures ont été effectuées aux 2e, 3e, 6e et 8e jours d'incubation dans un milieu liquide renfermant 1 % d'amidon, 5 % de solution saline de Winogradsky et 0,05 % de terre destinée à l'ensemencement. 200 cm³ de ce milieu sont mis dans une fiole de Roux d'une capacité de 1 litre, disposée horizontalement à l'étuve. Dans une deuxième fiole, 3,2 % d'humate calcique sont ajoutés au milieu. Les *Clostridium pastorianum* et les *Azotobacter chroococcum* envahissent rapidement ces milieux. 5 cm³ de milieu sont prélevés, mélangés avec 1 cm³ de toluène et 10 cm³ de solution-tampon PB3 contenant 2,5 % d'asparagine. Un témoin est effectué avec le milieu préalablement maintenu pendant 30 minutes à 100°. Après 21 heures à 49°, on procède à la distillation; l'activité de l'asparaginase rapportée en volume d'ammonium N/25 est de 0,29 cm³, elle est donc faible.

La mesure de l'activité de l'asparaginase a également été effectuée sur du mucus d'*Azotobacter chroococcum*. La totalité du mucus recouvrant entièrement une boîte de Pétri de 10 cm de diamètre donne dans les conditions précédentes de mesure 1,3 cm³ d'ammonium N/25. Cette activité enzymatique semble encore trop faible pour rendre compte de l'augmentation d'activité de l'asparaginase observée dans certains sols enrichis en cellulose. On ne peut cependant exclure la possibilité de son intervention au moins dans la phase finale de cette augmentation d'activité.

Quantité de nitrate dans le milieu de culture	Absence d'humus dans le milieu de culture	Présence de 2 % d'humate calcique dans le milieu de culture
%		
0	0,05	0,30
0,025	0,69	1,34
0,05	2,80	2,00
0,1	1,28	3,20
0,2	0,96	7,78

Tableau 37. — *Activité de l'asparaginase dans différentes cultures microbiennes.* Ces cultures sont obtenues dans des milieux contenant 2 % d'amidon, 2 % de calcaire, 10 % de solution saline de Winograsdky, 0,02 % de terre et différentes quantités de nitrate de potassium; ces milieux renferment ou non de l'humus. 100 cm³ de milieu sont mis dans une fiole d'Erlenmeyer de 500 cm³; après 4 jours d'incubation à 30° on effectue une mesure de l'activité de l'asparaginase. Pour cela 5 cm³ de milieu sont mélangés avec 10 cm³ de solution-tampon PB3 contenant 2,5 % d'asparagine; après 21 heures à 49° on procède à la distillation. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

On doit en outre signaler ici des mesures réalisées à partir de milieux contenant de l'amidon et des quantités croissantes de nitrate de potassium (0, 0,025 %, 0,05 %, 0,1 % et 0,2 %), ces milieux renfermant ou non de l'humate de calcium. Les résultats de ces mesures sont rapportés au tableau 37; ils traduisent une influence favorable du nitrate et de l'humus sur la production d'asparaginase. En l'absence d'azote, les *Clostridium pastorianum* et les *Azotobacter chroococcum* sont présents simultanément; comme précédemment ils donnent lieu à une très faible activité enzymatique. Dans les milieux contenant 0,025 % de nitrate de potassium, la production d'asparaginase est déjà mesurable; les *Clostridium* et les *Azotobacter* y sont présents à côté d'autres microorganismes. Dans les milieux contenant davantage de nitrate l'activité de l'asparaginase est encore plus élevée; on n'y observe plus de fixateur. Il résulte de ces mesures et de celles qui précèdent que la participation des fixateurs d'azote à l'activité de l'asparaginase des sols pourrait être nulle ou très réduite.

3. *Humivores :* Comme cela a été établi au moyen du carbone marqué (109/ p. 142), la dégradation d'une substance organique facilement décomposable ajoutée au sol, a pour effet d'accélérer l'oxydation de la matière organique du sol. Or l'augmentation d'activité de l'asparaginase observée dans les sols enrichis en cellulose ne serait pas due, d'après les résultats précédents, à une production de cette enzyme par les cellulolytiques; elle pourrait donc dépendre de l'activité microbienne d'oxydation de la matière organique du sol, ce qui conduit à rechercher l'activité de l'asparaginase chez les microorganismes humivores.

Un milieu solide au gel de silice renfermant 2,7 % d'humate calcique, 5 % de solution saline de Winogradsky, 1 % de calcaire et quelques milligrammes de terre saupoudrés à la surface du gel, se recouvre de petites colonies blanches espacées d'Actinomycètes signalées par R. Didier de Saint-Amand (24). Ces colonies apparaissent en 3 jours, leur nombre croît pendant une quinzaine de jours mais elles demeurent de petite taille. Le nombre et la taille des colonies ne sont pas affectés par la présence de nitrate de potassium ou de sulfate d'ammonium ajoutés à la dose de 0,1 %. La totalité des colonies d'Actinomycètes d'une boîte de Pétri de 16 cm de diamètre, ayant séjourné pendant 1 mois à l'étuve a été mise en suspension dans 10 cm^3 d'eau. Une mesure de l'activité enzymatique a été effectuée comme précédemment, à partir de 5 cm^3 de cette suspension auxquels ont été ajoutés 1 cm^3 de toluène et 10 cm^3 de solution-tampon PB3 contenant 2,5 % d'asparagine. La production d'ammonium dans ces conditions était de 0,05 cm^3 N/25, en 21 heures à 49°; elle correspond à une activité enzymatique nulle.

Dans le but de déterminer si l'activité de la microflore humivore subissait l'influence de la cellulolyse, un disque de cellulose de 9 mm de diamètre et 1 mm d'épaisseur a été déposé à la surface du milieu renfermant 0,1 % de nitrate de potassium. L'attaque de ce disque est très avancée au 11e jour d'incubation, mais ceci ne modifie pas la densité ou la dimension des colonies d'Actinomycètes à la surface du gel. Aucun des 3 groupes de microorganismes étudiés ne semble donc impliqué dans l'augmentation d'activité de l'asparaginase observée dans les sols enrichis en cellulose.

Substances du sol solubles dans l'eau.

L'aptitude du sol à présenter une activité enzymatique accrue lorsqu'il a été incubé à 30° après addition de cellulose, n'est pas constante au cours de l'année. Ainsi les échantillons βJA et δJA prélevés au même endroit, à quelques mois d'intervalle, se comportent différemment : alors que l'incubation du sol enrichi en cellulose provoque une augmentation d'activité de l'asparaginase dans le premier échantillon, elle est sans effet sur le deuxième. En outre, la production de gaz carbonique au cours des premiers jours d'incubation dans le deuxième échantillon enrichi en cellulose est semblable à celle des terres qui ne reçoivent pas de cellulose. Elle décroît régulièrement : l'attaque de la cellulose n'a donc pas eu lieu.

Les mesures rapportées au tableau 38 montrent que l'aptitude du sol à accroître son activité enzymatique a pu être restaurée par le lavage. La terre enrichie ou non en cellulose et incubée à 30° est quotidiennement lavée par une même quantité d'eau; l'eau utilisée est soit réemployée, soit chaque fois renouvelée. Dans la terre non enrichie en cellulose l'activité de l'asparaginase ne subit pas de changement appréciable au cours de l'incubation. Dans la terre enrichie elle demeure pratiquement constante pendant la période où sont pratiqués les lavages quotidiens; elle augmente après cessation de ce traitement. Que l'eau utilisée soit ou non renouvelée, l'effet du lavage est le même.

Nombre de jours		1	2	3	5	6	7	8	9	13
Traitements :										
sol + cellulose.	(M)	1,37	1,56	1,68	1,68	1,54	1,71	1,73	1,78	*3,98*
sol + cellulose.	(D)	1,48	1,39	1,68	1,60	1,60	1,71	1,51	1,68	*3,68*
sans cellulose...	(M)	1,39	1,39	1,59	1,37	1,54	1,68	1,71	1,46	1,35
sans cellulose...	(D)	1,59	1,68	1,93	1,51	1,17	1,51	1,71	1,51	1,40

Tableau 38. — *Influence du lavage et de l'incubation du sol δJA enrichi ou non en cellulose, sur son activité enzymatique.* A 200 g de terre auxquels ont été ou non ajoutés 2 g de cellulose en poudre, est mélangée une quantité d'eau identique à celle qui demeure dans le sol après lessivage puis essorage sur entonnoir de Buchner (humidité équivalente). La terre humide est mise à l'étuve dans une boîte de Pétri de 20 cm de diamètre. Chaque jour, sauf les 4e, 9e, 10e, 11e, 12e et 13e jours, le sol est mis sur entonnoir de Buchner, lavé par 50 cm³ d'eau, puis essoré. L'eau est soit réemployée (M), soit renouvelée à chaque lavage (D). 15 g de terre humide sont chaque fois prélevés puis séchés à l'air. 5 g de terre sèche sont mélangés avec 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon PB3 et 1,66 % d'asparagine; après 21 heures à 49° on procède à la distillation. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

Ces résultats traduisent une double influence du lavage. La première est favorable; elle résulte vraisemblablement de l'élimination de substances solubles qui inhibaient la cellulolyse et par suite l'accroissement d'activité de l'asparaginase dans le sol. La dilution de ces substances dans la même eau de lavage permet également l'augmentation d'activité de l'asparaginase. La deuxième influence du lavage est défavorable; elle pourrait être attribuée à l'entraînement de substances indispensables au déroulement des processus impliqués dans l'augmentation d'activité de l'asparaginase, en particulier de l'azote minéral nécessaire à la cellulolyse.

L'étude de l'influence du lavage sur l'activité enzymatique du sol enrichi ou non en cellulose a également été conduite sur un sol de culture de Bondy (région parisienne) les mesures correspondantes sont rapportées à la figure LVI. Comme pour les sols tropicaux βJA, βSA et βSB, l'incubation du sol de Bondy enrichi en cellulose provoque une augmentation d'activité de l'asparaginase. Lorsque l'incubation est précédée du lavage du sol par l'eau, l'augmentation d'activité de l'asparaginase est moins importante qu'en l'absence de lavage, ce qui traduit une influence défavorable de celui-ci. Cependant si l'on considère la durée de la période qui précède l'intensification du dégagement de gaz carbonique et de l'activité enzymatique, on constate qu'elle est réduite par le lavage, ce qui est particulièrement marqué dans le cas de l'addition complémentaire d'azote; ceci indique une influence favorable du lavage. On retrouve donc ici la double influence de ce traitement précédemment observée avec le sol βJA.

Sur 24 échantillons de terre examinés, l'effet favorable d'une addition complémentaire d'azote nitrique sur l'activité de l'asparaginase dans le sol enrichi en cellulose, ne s'est présenté que dans le sol de Bondy.

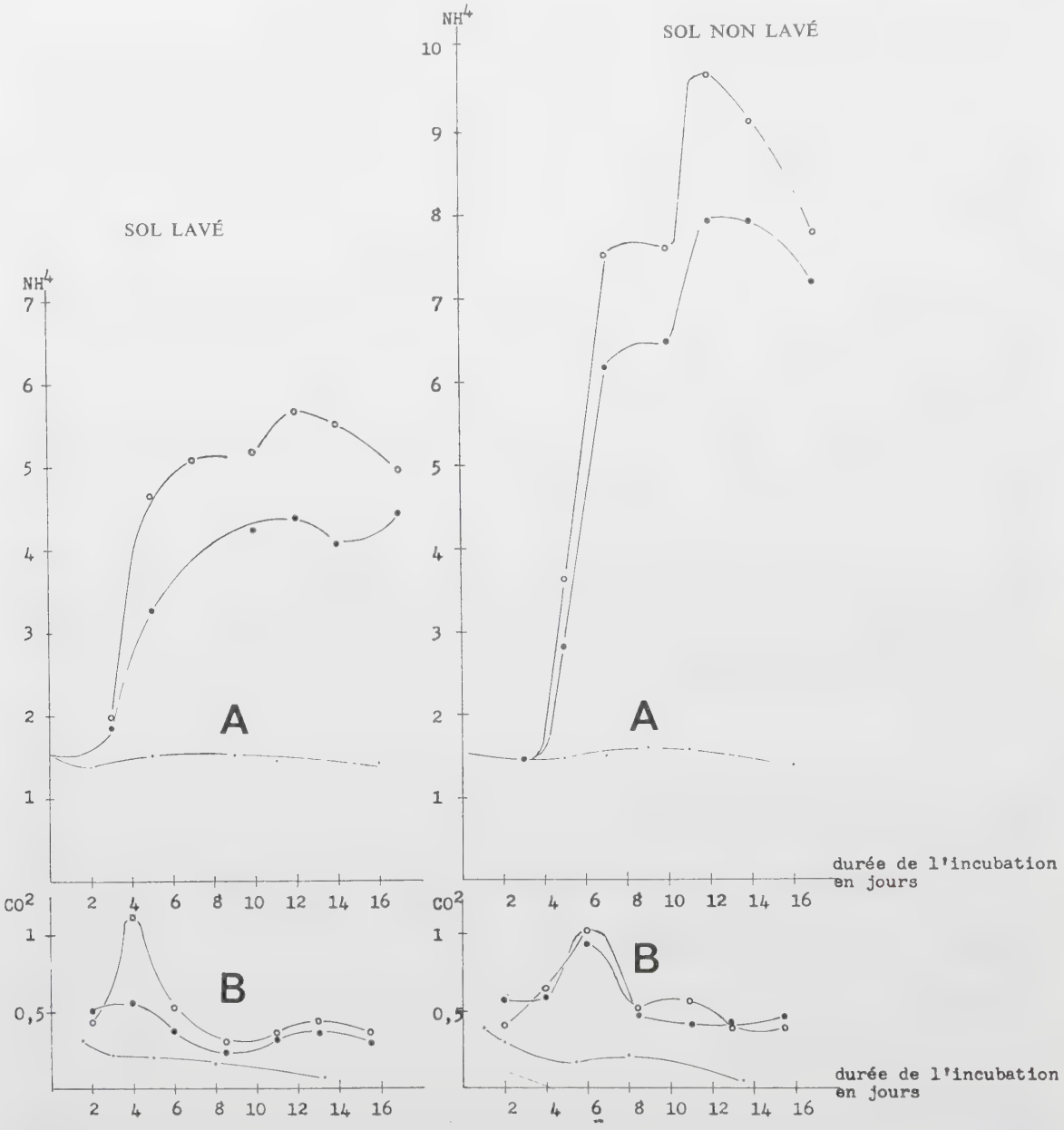


Fig. LVI. — ACTIVITÉ DE L'ASPARAGINASE ET DÉGAGEMENT DE GAZ CARBONIQUE DANS LE SOL DE BONDY MAINTENU HUMIDE A 30°. INFLUENCE DE LA CELLULOSE, DU NITRATE ET DU LAVAGE DU SOL SUR L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE ET LA PRODUCTION DE CO_2

— La production de gaz carbonique est mesurée directement sur l'échantillon incubé; elle est exprimée en mg de CO_2 par 24 heures, pour 5 g de terre.

— L'activité de l'asparaginase est mesurée sur le sol séché après différents temps d'incubation (5 g de sol sec sont mélangés avec 15 cm³ de solution contenant 10 cm³ de solution-tampon PB3 et 1,66% d'asparagine, 21 heures à 49°); les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25.

— Sol lavé : On fait passer à l'aide du vide, 200 cm³ d'eau à travers 200 g de terre placée sur entonnoir de Buchner; cette opération est effectuée à nouveau après 30 minutes, puis le sol est essoré.

— Sol non lavé : A 200 g de sol on ajoute la quantité d'eau correspondant à l'humidité équivalente : 33 cm³.

A - Activité de l'asparaginase;

B - Dégagement de CO_2.

· Sol non enrichi en cellulose.
• Sol additionné de 0,5 % de cellulose.
o Sol additionné de 0,5 % de cellulose et de 0,006 ‰ d'azote nitrique.

Interprétation.

Les mesures de l'activité enzymatique de microorganismes appartenant à quelques groupes physiologiques du sol, n'a pas permis d'identifier les germes responsables de l'augmentation d'activité de l'asparaginase observée dans les sols enrichis en cellulose. Cependant les microorganismes étudiés se développaient dans des milieux simples, donc très différents du milieu naturel, si bien que leur équipement enzymatique pouvait être lui-même différent de celui qu'ils possèdent effectivement dans le sol. On ne peut donc conclure avec certitude que l'asparaginase dont l'activité est mesurée après enrichissement du sol en cellulose, n'appartient pas à ces microorganismes.

L'étude de l'influence de substances du sol solubles dans l'eau a permis de mettre en évidence l'intervention sur le développement de l'activité enzymatique du sol, de substances nutritives ou toxiques. Ces mesures montrent que dans le sol, l'influence de l'eau sur l'activité biologique n'est pas limitée au maintien d'une humidité suffisante; elle intervient également par son effet de lessivage ou de dilution de substances du sol.

La présence, dans les sols, de substances fermentescibles solubles dans l'eau est rapportée par I.L. Stevenson (101) et H.F. Birch (6), (7), (8). Ces auteurs ont montré que la dessication puis la réhumectation du sol amène une augmentation de la quantité de substances organiques solubles. La rapide minéralisation de ces substances est partiellement responsable de l'intense dégagement de gaz carbonique qui suit la réhumectation. L'adsorption de ces substances par le charbon de bois amène une diminution de l'amplitude du flux de production de gaz carbonique (7), diminution d'autant plus accusée que la quantité de charbon de bois mélangé avec le sol est plus grande. L'effet défavorable du charbon de bois sur la respiration peut être rapproché de l'influence de grandes quantités de cellulose sur l'augmentation d'activité enzymatique, laquelle pourrait être freinée par l'adsorption de certaines substances du sol par la cellulose. Ce parallélisme se présente à nouveau lors du séchage ultérieur du sol, lequel atténue considérablement l'effet de ces deux corps. Ainsi, lorsque le sol βJA additionné de 5 % de cellulose est séché après quelques jours d'incubation, puis réhumecté, il se produit une nouvelle augmentation d'activité de l'asparaginase deux fois plus importante que la précédente (fig. LV).

La production de gaz carbonique au cours du premier jour d'incubation, n'est pas affectée par la présence de cellulose. Les substances adsorbées par la cellulose ne représenteraient donc qu'une fraction peu importante de la masse totale de matières organiques solubles.

Le lavage du sol peut, non seulement éliminer des substances organiques, mais aussi entraîner du nitrate. Dans le sol de Bondy qui renferme 28 p.p.m. d'azote nitrique, l'entraînement du nitrate est vraisemblablement intervenu dans la limitation de la cellulolyse et par suite de l'activité enzymatique. Une influence favorable du nitrate sur la production de gaz carbonique et l'activité de l'asparaginase dans le sol de Bondy enrichi en cellulose est, en effet, mise en évidence par les résultats rapportés à la figure LVI.

En résumé, des substances du sol solubles dans l'eau semblent impliquées dans l'augmentation d'activité de l'asparaginase dans les sols enrichis en cellulose. Les résultats obtenus n'ont cependant pas permis de localiser l'intervention de ces substances dans le processus, ni d'établir quels sont les microorganismes responsables. On ne peut donc préciser dans quelle mesure l'augmentation d'activité enzymatique est due, d'une part, à une synthèse de l'enzyme et, d'autre part, à un accroissement de son accessibilité à l'intérieur des cellules présentes dans le sol. En outre, l'activité initiale de l'asparaginase et l'activité nouvelle résultant de la dégradation de la cellulose ne sont pas nécessairement liées aux mêmes microorganismes.

L'influence de la cellulolyse sur l'activité de l'asparaginase des sols est cependant intéressante du point de vue de la signification de la mesure. En effet l'augmentation d'activité de l'asparaginase peut atteindre ou même dépasser l'activité initiale (fig. XLIX, L, LVI). Or elle se produit dans

des conditions écologiques; elle est donc en rapport avec des processus dont le sol est habituellement le siège. Il en résulte que l'activité de l'asparaginase pourrait constituer un moyen très sensible de suivre ces processus dans le sol.

VIII. — ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ DE L'ARPARAGINASE ET DE SA RÉPONSE A L'ADDITION DE CELLULOSE, EN RELATION AVEC LA FERTILITÉ DES SOLS

L'activité biologique des sols évaluée en relation avec la fertilité a retenu l'attention des auteurs dans de nombreuses études consacrées à la biologie des sols. Quelles sont les possibilités d'emploi des mesures enzymatiques dans cette orientation des recherches? Nous avons rapporté les observations de H. Kœpf relatives aux fluctuations de l'activité enzymatique sous l'influence des racines, à sa stabilité en sol nu et à son inertie plus ou moins accusée envers les pratiques culturales. L'augmentation d'activité de l'asparaginase, lors de l'incubation du sol enrichi en cellulose, permet d'introduire un aspect dynamique dans l'étude des enzymes du sol. A la mesure de l'activité enzymatique d'un échantillon pourrait ainsi être adjointe celle de l'aptitude du sol à accroître cette activité dans des conditions où n'interviennent pas les enzymes des racines.

A partir de quelques sols de niveau de fertilité différent, nous avons recherché dans quelle mesure cet aspect dynamique apporte une information permettant une meilleure appréciation de la valeur de ces sols. Des tests microbiologiques ont également été réalisés dans le but de comparer la technique enzymatique aux techniques proprement microbiologiques.

Sols employés.

Les échantillons ont été fournis par le service de physique du sol des Services Scientifiques Centraux de l'O.R.S.T.O.M. (BONDY).

1. Sols provenant de la République Centrafricaine (région de Grimari)

Sols faiblement ferralitiques sur gneiss.

Première série de sols. Prélèvements effectués à différentes saisons : en septembre (maximum des pluies), novembre (début de la saison sèche) et mars (fin de la saison sèche).

GRI/S : sous savane, pH 6,5 (sept.), 6 0 (nov.) 6,1 (mars).
GRI/C31 : 8 ans de culture, pH 5,8 (sept.), 5,7 (nov.), 5,5 (mars).
GRI/C2 : 4 ans de jachère sur 4 ans de culture, pH 5,9 (sept.), 6,0 (nov.), 6,0 (mars).

Deuxième série de sols.

GRI/EA1 : témoin sous savane; pH 5,8.
GRI/EA5 : culture indigène améliorée avec apport de fumier; pH 5,9.
GRI/EA6 : sol cultivé le plus dégradé; aucun apport de fumure; pH 5,3.

Troisième série de sols.

IV : témoin sous savane; pH 6,0.
XXV : sol sous coton très dégradé; pH 5,5.

2. Sols provenant du Togo (région d'Atakpame)

Sols noirs tropicaux sur amphibolite, sous culture de coton. La végétation climatique est la savane. Les échantillons P3 proviennent du meilleur emplacement de la parcelle au point de vue stabilité structurale; les échantillons P4 proviennent du plus mauvais emplacement.

P3/2A : Prélèvement de 0 à 15 cm de profondeur pH 6,5.
P3/2B : — 15 à 30 cm — pH 6,4.
P4/4A : — 0 à 15 cm — pH 6,6.
P4/4B : — 15 à 30 cm — pH 6,5.

3. Sol provenant du Sénégal (région de Casamance)

Sol ferrugineux tropical, très sableux, cultivé depuis plusieurs années en arachide, sol épuisé. CAS : pH 5,1.

Mesure de l'activité de l'asparaginase.

Les résultats rapportés au tableau 39 montrent que l'influence favorable de l'incubation du sol enrichi en cellulose se manifeste dans la plupart des sols. En outre, comme cela a été observé précédemment, l'addition de 5 % de cellulose a un effet nettement moins marqué que celui qui résulte d'une addition dix fois moins importante. Quant au lavage du sol enrichi en cellulose, préalablement à l'incubation, il provoque soit une élévation, soit une diminution de l'intensification de l'activité de l'asparaginase; on retrouve donc ici la double influence de ce traitement. L'incubation du sol non enrichi en cellulose, lavé ou simplement humidifié, n'affecte pas sensiblement l'activité enzymatique, à l'exception de l'échantillon GRI/S septembre. Dans les sols du Togo, l'activité enzymatique diminue avec la profondeur du prélèvement, ce qui est en accord avec les observations rapportées par de nombreux auteurs; de plus, dans l'échantillon P4, la réponse de l'activité enzymatique à l'addition de cellulose est plus élevée dans l'échantillon de surface que dans l'échantillon de profondeur. La saison à laquelle le prélèvement est effectué a peu d'influence sur l'activité enzymatique des échantillons non traités. Par contre, l'activité enzymatique mesurée après incubation des sols additionnés de 0,5 % de cellulose, est sensiblement affectée par la période du prélèvement dans les sols GRI/S et GRI/C31; cependant le lavage préalable du sol atténue l'influence saisonnière dans ces deux sols.

Lorsque l'on considère les activités enzymatiques à l'intérieur des différentes séries de sols, on s'aperçoit qu'elles sont en accord avec les données concernant les niveaux de fertilité. Dans les échantillons du Togo le classement établi d'après l'activité enzymatique des sols non traités ou incubés en l'absence de cellulose, fait ressortir le maximum de différence. Dans la deuxième série de sols de Grimari, les plus grandes différences sont obtenues par l'incubation effectuée avec 0,5 % de cellulose. Dans la troisième série l'effet de la cellulose n'est important qu'après lavage du sol. Ceci conduit, du point de vue agronomique, à adopter un indice enzymatique correspondant à la somme des activités mesurées, d'une part, dans les échantillons non traités et, d'autre part, dans les échantillons incubés après lavage et addition de 0,5 % de cellulose (tableau 39, dernière colonne).

Désignation de l'échantillon	C %	T	A	B	C	AL	BL	CL	T + BL
GRI/S septembre	1,67	2,04	3,27	6,62	3,24	2,07	4,99	2,50	7,03
novembre	1,53	1,72	1,74	3,59	2,00	1,88	2,78	2,02	4,50
mars	1,88	2,11	2,46	4,03	2,71	2,52	4,00	2,75	6,11
GRI/C31 septembre	1,29	1,27	0,94	3,35	1,47	0,98	2,62	2,06	3,89
novembre	1,26	1,17	1,18	2,65	1,71	1,14	2,16	1,58	3,33
mars	1,24	0,73	0,64	1,06	1,16	0,69	2,68	1,12	3,41
CRI/C2 septembre	1,40	2,52	2,19	3,36	2,57	1,93	2,88	2,53	5,40
novembre	1,47	2,32	2,45	3,16	2,64	2,31	4,00	3,03	6,32
mars	1,42	2,40	2,11	2,44	2,39	1,98	2,80	2,25	5,20
GRI/EA 1	1,32	0,81	0,93	0,92	0,93	0,96	0,97	0,91	1,78
GRI/EA 5	1,30	0,85	1,02	1,85	1,14	0,83	1,92	1,41	2,77
GRI/EA 6	0,96	0,50	0,48	0,52	0,68	0,53	0,63	0,64	1,13
IV	1,40	1,23	1,39	1,59	1,50	1,28	2,32	2,54	3,55
XXV	0,92	1,09	0,92	0,90	0,94	0,93	0,98	1,06	2,07
P3/2A	1,40	3,80	3,11	3,12	3,03	3,13	3,36	3,47	7,16
P3/2B	1,15	2,92	2,22	2,21	2,30	2,26	2,29	2,51	5,28
P4/4A	1,30	1,87	1,33	1,99	1,78	1,56	2,91	2,58	4,78
P4/4B	1,10	1,29	1,26	1,17	1,19	1,21	1,41	1,48	2,70
CAS	0,65	0,03	0,15	0,19	0,15	0,10	0,16	0,25	0,19

Tableau 39. — *Activité de l'asparaginase dans différents sols.* 5 g de sol sec + 10 cm³ de solution-tampon PB3 contenant 2,5 % d'asparagine; 21 heures à 49°. Les résultats sont rapportés en cm³ d'ammonium N/25. Les sols incubés ont été amenés à humidité équivalente puis maintenus pendant 7 jours à 30° dans une fiole d'Erlenmeyer de 150 cm³ à raison de 15 g de sol par fiole; ils ont ensuite été séchés puis soumis à la mesure enzymatique. T : sol témoin non traité. A : sol amené à l'humidité équivalente préalablement à l'incubation. B et C : sol additionné respectivement de 0,5 % et 5 % de cellulose puis amené à l'humidité équivalente préalablement à l'incubation. TL, AL, BL et CL : traitements homologues dans lesquels le sol est non plus humecté par la quantité d'eau correspondant à l'humidité équivalente, mais lavé sur entonnoir de Buchner par 20 cm³ d'eau, essoré, puis après 1 heure lavé à nouveau par 20 cm³ d'eau et essoré. Dans la dernière colonne (T + BL) sont mentionnées les sommes des activités rapportées, pour un même sol, dans les colonnes T et BL. Dans la première colonne sont mentionnées les teneurs en carbone.

Résultats de quelques tests microbiologiques (azote minéralisable, nitrification en milieu liquide et numération des fixateurs d'azote, tableau 40).

L'azote minéralisable a été évalué suivant une technique très voisine de celle qui est préconisée par C. Moureaux (87). Le sol amené à humidité équivalente est maintenu à 30° à l'étuve pendant 28 jours dans une fiole d'Erlenmeyer de 150 cm³ muni d'un bouchon à un trou. Ensuite on ajoute de l'eau, on agite puis centrifuge et l'on prélève une partie aliquote du surnageant qui est amenée à sec en présence de carbonate de soude. On reprend par le réactif phénoldisulfonique et l'ammoniaque; il se développe une couleur jaune qui est comparée au moyen d'un colorimètre à celles d'une gamme étalon. L'azote minéralisable est représenté par la différence entre la quantité de nitrate contenue dans le sol après 28 jours d'incubation et la quantité initiale.

D'après les résultats obtenus pour les cinq premières séries d'échantillons, la minéralisation de l'azote est plus intense dans les sols cultivés que dans les sols témoins sous végétation naturelle. Elle est soit amplifiée soit réduite par l'addition de calcaire, lequel amène dans tous les sols le pH entre les valeurs 7,0 et 7,5. Dans les sols prélevés à différentes périodes de l'année le calcaire efface l'influence saisonnière. Dans les échantillons du Togo la minéralisation de l'azote en l'absence

Désignation de l'échantillon	Azote minéralisable		Vitesse de nitrification			Fixateurs : *Azotobacter* et *Beijerinckia*		
	T	Ca	I	T	Ca	I	T	Ca
GRI/S septembre..	27	36	2	21	22	*67*	*35*	*65*
novembre..	12	35	2	9	14	*28*	*12*	*20*
mars.....	14	38	2	6	16	113	75	80
GRI/C31 septembre	38	43	11	19	22	27	20	10
novembre	38	53	10	16	17	58	50	50
mars...	50	55	7	14	22	22	16	7
GRI/C2 septembre	49	53	8	10	16	—	100	45
novembre.	39	51	5	13	14	226	200	80
mars.....	51	51	2	16	19	164	—	115
GRI/EA1.....	16	12	2	3	3	41	25	30
GRI/EA5.....	65	47	2	8	14	235	200	200
GRI/EA6.....	36	27	2	4	8	8	15	13
IV.....	13	31	2	4	14	15	24	12
XXV.....	20	27	2	5	16	54	45	23
P3/2A.....	26	22	11	18	19	*86*	*164*	*214*
P3/2B.....	24	22	11	16	16	*82*	*136*	*216*
P4/4A.....	20	22	11	16	16	*71*	*70*	*87*
P4/4B.....	12	21	11	10	16	*71*	*48*	*66*
CAS.....	2	1	0	0	0	0	0	0

Tableau 40. — *Résultats de quelques tests microbiologiques appliqués à des sols présentant divers niveaux de fertilité.*
I : Mesure effectuée sur l'échantillon de terre non traité.
T : Mesure effectuée sur le sol amené à humidité équivalente puis maintenu pendant 28 jours à 30°.
Ca : Mesure effectuée sur le sol additionné de 2 % de CO^3Ca, amené à humidité équivalente puis maintenu pendant 28 jours à 30°.
Dans les colonnes où sont mentionnés les fixateurs d'azote, les nombres en italique correspondent au genre *Azotobacter*, les autres au genre *Beijerinckia*.

de calcaire est en accord avec l'indice enzymatique. Dans ces sols l'addition de calcaire a pour effet de rapprocher toutes les valeurs, lesquelles ne traduisent plus ni l'emplacement ni la profondeur du prélèvement. La minéralisation de l'azote est nulle dans l'échantillon CAS.

L'activité nitrifiante a été mesurée suivant la technique de J. KAUFFMANN et M^lle^. G. BOQUEL (61). Une suspension de sol est préparée par agitation mécanique alternative de 15 minutes, dans un tube à vis de 25 cm^3, de 2 g de terre et 20 cm^3 d'eau en présence de deux billes de verre ce qui détruit les agrégats. 2 cm^3 de cette suspension sont ajoutés, dans une fiole d'Erlenmeyer de 100 cm^3, à 25 cm/ de milieu renfermant 200 mg de sulfate d'ammonium, 50 cm^3 de solution saline de WINOGRADSKY et 10 g de calcaire par litre. On suit tous les deux jours l'apparition puis la disparition des nitrites au moyen du réactif de GRIESS. Les résultats rapportés au tableau représentent la somme des valeurs obtenues en faisant respectivement la différence à 12 et à 30 du nombre de jours écoulés, d'une part, avant l'apparition des nitrites et, d'autre part, avant leur disparition.

La nitrification est généralement très faible ou seulement faible (sols du Togo) dans les sols non incubés, peut être à cause du stockage prolongé de ces échantillons récoltés depuis 18 mois. L'incubation préalable des sols enrichis en calcaire augmente généralement très fortement l'activité nitrifiante, sauf dans les échantillons GRI/EA1 et GRI/EA6 où les valeurs demeurent faibles ainsi que dans le sol CAS où la nitrification est nulle. Le classement de ces trois sols est identique à celui qui est obtenu au moyen de l'indice enzymatique. Les mesures effectuées sur les échantillons prélevés à différentes saisons et sur les sols GRI/EA1, GRI/EA5 et GRI/EA6 montrent que la

mise en culture a un effet favorable sur l'activité nitrifiante, ce qui avait également été observé lors de la mesure de la minéralisation de l'azote.

La numération des fixateurs d'azote des genres *Azotobacter* et *Beijerinckia* est effectuée sur un même milieu solide préparé à partir de silicosol suivant la technique exposée antérieurement. Le silicosol est mélangé à volume égal avec un milieu renfermant 100 cm³ de solution saline de WINOGRADSKY, 20 g de glucose et 20 g de calcaire par litre. On ensemence avec 1 cm³ de suspension de terre obtenue comme précédemment.

Dans les sols du Togo et dans les échantillons GRI/S septembre et GRI/S novembre on trouve uniquement des *Azotobacter*; la croissance rapide des colonies, leur étalement et leur nombre élevé empêchent l'apparition éventuelles des colonie de *Beijerinckia*. Dans tous les autres sols ce sont les *Beijerinckia* qui dominent mais on trouve également des *Azotobacter* en très petit nombre. Le fait que les fixateurs d'azote les plus nombreux ne soient pas les mêmes dans les différents échantillons du sol GRI S et la variabilité de la teneur en carbone dans ce sol semblent traduire l'hétérogénéité de la parcelle où sont effectués les prélèvements. Contrairement aux nitrificateurs, les fixateurs d'azote sont généralement peu affectés par l'incubation préalable du sol. Cependant dans le sol P3 l'incubation, surtout lorsqu'elle est effectuée après addition de calcaire, a pour effet d'augmenter considérablement le nombre de germes fixateurs, ce qui permet de mieux différencier ce sol de l'échantillon P4 en accord avec les résultats des mesures enzymatiques et de stabilité structurale.

Discussion.

Le rôle des microorganismes dans le sol réside essentiellement dans leur action minéralisatrice, laquelle permet le maintien de la vie à la surface du Globe; un autre aspect très important de l'activité des microorganismes réside dans l'élaboration des substances humiques. Le type d'humus (Mull, Mor, Tourbe) etant sous la dependance des facteurs pédogénétiques (végétation, roche mère, climat), on peut s'attendre à ce que l'influence de ces facteurs se traduise également dans les populations microbiennes. C'est ce que montrent les études de D. LAVERGNE (72) et Y. DOMMERGUES (25). D'autre part, de la conservation des substances humiques dans le sol dépend le maintien du niveau de fertilité. Les mesures de l'activite microbienne devraient donc permettre d'évaluer celui-ci et de suivre les changements qui y sont apportes sous l'influence des pratiques culturales. C. MOUREAUX (88) propose un indice de fertilité basé sur la combinaison des résultats de trois techniques microbiologiques : azote minéralisable, richesse minérale évaluée par l'*Aspergillus niger* et consommation du glucose dans le sol; l'auteur obtient une excellente corrélation entre la valeur de l'indice et le poids de récolte en pots. Quelques possibilités offertes par cette orientation agronomique des études de microbiologie du sol sont présentées par P. MANIL (75). D'après l'auteur, « juger de la valeur agricole actuelle d'un sol par voie microbiologique ou biochimique constitue une « méthode d'approche » qui en vaut bien d'autres et qui, c'est le moins que l'on puisse dire, ne risque que de donner un complément très sérieux d'informations ».

Cette notion de « méthode d'approche » traduit, au moins partiellement, l'insuffisance des techniques mises en œuvre. En effet, seules les mesures de la production de gaz carbonique ou d'azote minéralisable concernent l'activité réelle des microorganismes dans le sol; mais elles n'apportent qu'une information globale. Les autres techniques mettent en jeu des perturbations apportées au milieu naturel; elles font appel à la prolifération des microorganismes, soit dans le sol où sont ajoutées des substances fermentescibles, soit sur des milieux électifs où est ensemencé le sol.

Il apparaît donc que l'étude des activités de la microflore dans les sols, pose du fait de la complexité du milieu des problèmes de technologie. A cet égard les mesures enzymatiques se situent au niveau des activités microbiennes au sein même du sol. Elles ne font pas appel à une multiplication de cellules. Les mesures effectuées sur quelques sols présentant divers niveaux de fertilité montrent que l'indice enzymatique représenté par la somme des activités de l'asparaginase mesurées, d'une part, dans le sol non traité et, d'autre part, dans le sol additionné de 0.5 % de cellulose puis incubé pendant 7 jours à 30°, permet de différencier d'une manière satisfaisante les sols examinés. Cette valeur semble sinon plus étroitement, du moins plus généralement en accord avec les données relatives à la fertilité que les valeurs obtenues par les autres techniques biologiques employées. Dans le cas des échantillons IV et XXV, seul l'indice enzymatique permet un classement conforme à la fertilité.

CONCLUSION

L'utilisation des techniques enzymatiques dans l'évaluation de l'activité biologique des sols s'est généralisée depuis une dizaine d'années. La plupart de ces techniques sont d'une grande facilité d'emploi; elles présentent en outre l'avantage de situer la mesure au sein même du sol sans modifier le paysage microbien par multiplication des cellules. Divers auteurs ont formulé l'hypothèse suivant laquelle les enzymes s'accumuleraient dans le sol par adsorption après la lyse des cellules, si bien que l'activité enzymatique ne concernerait que partiellement les microorganismes vivants au moment de la mesure.

L'étude de l'activité enzymatique des sols que nous avons effectuée a porté sur l'asparaginase, enzyme très peu étudiée dans les sols et dont l'activité est mesurée au moyen d'un dosage commode et sûr, celui de l'ammonium. Cette étude répond à deux objectifs: d'une part, déterminer si l'asparaginase dont l'activité est mesurée dans les sols s'y trouve soit accumulée par adsorption, soit liée aux structures cellulaires des microorganismes, d'autre part, rechercher des relations entre la mesure enzymatique et l'activité de la microflore.

L'accumulation de l'asparaginase hors des cellules, dans le sol, semble infirmée par l'étude comparative de l'asparaginase de levure, étude concernant, d'une part, la stabilité au séchage et l'élution de l'asparaginase adsorbée dans les sols à partir d'une préparation privée de cellules et, d'autre part, l'influence du nitrate sur l'activité de l'asparaginase de cellules intactes de levure. Le comportement de l'enzyme du sol est semblable à celui de l'asparaginase des cellules; il est par contre différent de celui de l'asparaginase adsorbée.

La dégradation de la cellulose dans les sols amène généralement une augmentation d'activité de l'asparaginase qui commence à se manifester au début de la cellulolyse et peut atteindre ou même dépasser l'activité enzymatique initiale. Cette augmentation d'activité se produit dans des conditions très écologiques; elle est donc en rapport avec des processus dont le sol est habituellement le siège. Il en résulte que la mesure de l'activité de l'asparaginase peut constituer un moyen de suivre l'activité des microorganismes dans le sol.

La mesure de l'activité de l'asparaginase dans les sols enrichis en cellulose a permis de mettre en évidence des substances inhibitrices de l'activité microbienne, pouvant être éliminées par lavage du sol. Des substances nutritives, en particulier l'azote nitrique, sont également entraînées par l'eau; l'action du lavage est donc double, dans quelques sols l'effet dépressif est le plus important.

La possibilité d'effacer par le lavage du sol une influence passagère est un facteur intéressant quant à l'utilisation pratique de la mesure de l'activité de l'asparaginase. Dans le cadre d'études microbiologiques orientées vers l'agronomie, il importe non seulement de rechercher des indications qui soient en rapport avec la fertilité, mais également de supprimer les perturbations représentées par les fluctuations saisonnières. Comparée à d'autres mesures biologiques telles que l'azote minéralisable, la nitrification en milieu liquide, la densité des fixateurs d'azote, l'activité de l'asparaginase reflète d'une manière plus constante que celles-ci les niveaux de fertilité.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Alexandrov (I.B.). *Pochvovedenie*, 1959, n° 9, 73-77.
Sur les méthodes de détermination de l'activité de certains ferments du sol (russe).
2. Allison (F.E.), Roller (E.M.). *Soil Sci.*, 1955, **80**, 349-362.
A comparison of leaching and distillation procedures for determining fixed ammonia in soils.
3. Antoniani (C.), Montanari (T.), Camoriano (A.). *A. Fac. agr. Univ. Studi Milano*, 1954, **3**, 99-101.
Ricerche di enzymologia del terreno. 1. Attivita catepsinicosimili. Nota preliminare.
4. Bach (M.D.). *B. Soc. Chim. biol.*, 1929, **11**, 995-1006.
L'évolution de l'asparaginase dans les cultures de l'*Aspergillus niger*.
5. Baroccio (A.). *Agrochimica*, 1958, **2**, 243-257.
L'attivita catalasica del suolo come « indice biopedologico » di fertilita.
6. Birch (H.F.). *Plant & Soil*, 1958, **10**, 9-31.
The effect of soil drying on humus decomposition and nitrogen availability.
7. Birch (H.F.). *Plant & Soil*, 1959, **11**, 262-286.
Further observations on humus decomposition and nitrification.
8. Birch (H.F.). *Plant & Soil*, 1960, **12**, 81-96.
Nitrification in soils after differents periods of dryness.
9. Briggs (M.H.), Segal (L.). *Life Sci.*, 1963, **2**, 69-72.
Preparation and properties of a free soil enzyme.
10. Brunel (A.). *Traité Pratique de Chimie Végétale*, Georges frère, Tourcoing, 1948, **1**.
11. Brunel (A.). *Traité Pratique de Chimie Végétale*, Georges frère, Tourcoing, 1948, **2**.
12. Brunel (A.). *Traité Pratique de Chimie Végétale*, Georges frère, Tourcoing, 1949, **3**.
13. Chantrenne (H.). *The Biosynthesis of Proteins*, Pergamon Press, Oxford, 1961.
14. Clauss (D.), Mechsner (K.L.). *Plant & Soil*, 1960, **12**, 195-198.
Über die Brauchbarkeit der von Ed. Hofmann ausgearbeiteten Methoden zur Bestimmung der Enzyme im Boden.
15. Colowick (S.P.), Kaplan (N.O.). *Methods in Enzymology*, Acad. Press, New-York, 1955, **1**.
16. Colowick (S.P.), Kaplan (N.O.). *Methods in Enzymology*, Acad. Press, New-York, 1955, **2**, 383-384.
17. Conrad (J.P.). *Soil Sci.*, 1940, **49**, 253-263.
Hydrolysis of urea in soils by thermolabile catalysis.
18. Conrad (J.P.). *Soil Sci.*, 1940, **50**, 119-134.
The nature of the catalyst causing the hydrolysis of urea in soils.
19. Conrad (J.P.), Adams (C.N.). *J. Amer. Soc. Agron.*, 1940, **32**, 48-54.
Retention by soils of the nitrogen of urea and some related phenomena.
20. Conrad (J.P.). *Soil Sci.*, 1942, **54**, 367-380.
The occurence and origin of ureaselike activities in soils.
21. Conrad (J.P.). *J. Amer. Soc. Agron.*, 1942, **34**, 1102-1113.
Enzymatic vs. microbial concepts of urea hydrolysis in soils.
22. Conrad (J.P.). *Soil Sci. Soc. Amer. Proceed.*, 1943, **8**, 171-174.
Some effects of developing alkalinities and other factors upon ureaselike activities in soils.
23. Davtyan (G.S.). *Soviet Soil Sci.*, (Translation of Pochvovedeniye), 1958, n° 5, 544-547.
Principles of the agrochemical characterisation of soils.
24. Didier de Saint-Amand (R.). *VI^e Congr. int. Sci. Sol, Paris*, 1956, C, 425-429.
Contribution à l'étude de la dégradation de l'humus par les microorganismes du sol.
25. Dommergues (Y.). *Agron. trop.*, 1960, **15**, 61-72.
Un exemple d'utilisation des techniques biologiques dans la caractérisation des types pédologiques.
26. Drobnik (J.). *Folia Biol.*, 1955, **1**, 38-40.
Spaltung der Stärke durch den enzymatischen Komplex der Böden.
27. Drobnik (J.). *Ceskoslov. Mikrob.*, 1956, **1**, 47.
Stepeni asparaginu enzymatickym komplexem pud.
28. Drobnik (J.). *Plant & Soil*, 1960, **12**, 199-211.
Primary oxidation of organic matter in the soil. The form of respiration curves with glucose as the substrate.

29. Drobnik (J.). *Plant & Soil*, 1960, **12**, 212-222.
Primary oxidation of organic matter in the soil. Influence of various kinds of preincubations.
30. Drobnik (J.). *Plant & Soil*, 1961, **14**, 94-95.
On the rôle of toluene in the measurement of the activity of soil enzymes.
31. Drouineau (G.), Lefevre (G.) et M^me^ Blanc-Aicard. *Int. Soil Fert. Meeting, Dublin*, 1952, **1**, 13-21.
Estimation de la richesse des sols en azote et aspect particulier de ce problème dans la région méditerranéenne.
32. Durand (G.). *C.R. Acad. Sci.*, 1961, **252**, 1687-1689.
Sur la dégradation des bases puriques et pyrimidiques dans le sol : dégradation aérobie de l'acide urique.
33. Esterman (E.F.), Mc Laren (A.D.). *J. Soil Sci.*, 1959, **10**, 64-78.
Stimulation of bacterial proteolysis by adsorbents.
34. Esterman (E.F.), Mc Laren (A.D.). *Plant & Soil*, 1961, **15**, 243-260.
Contribution of rhizoplane organisms to the total capacity of plants to utilize organic nutrients.
35. Fermi (C.). *Zbl. Bakter. Parasit. Infekt.*, 1910, **26**, 330-334.
Sur la présence des enzymes dans le sol, les eaux et dans les poussières.
36. Galstyan (A. Sh.), Tsyupa (G.P.). *Isv. Akad. Nauk Armyan SSR Biol. Nauki*, 1959, **12**, 83-87.
Quelques problèmes sur l'étude de l'activité des amidases dans le sol (russe).
37. Galstyan (A. Sh.). *Soobshch. Labor. Agrok. Akad. Nauk Armyan SSR*, 1959, n° 2, 19-24.
Quelques questions concernant l'étude des enzymes du sol (russe).
38. Galstyan (A. Sh.). *Dokl. Akad. Nauk Armyan SSR*, 1961, **32**, 101-104.
Sur l'activité des carbohydrases dans le sol (russe).
39. Galstyan (A. Sh.). *Dokl. Akad. Nauk Armyan SSR*, 1963, **36**, 225-228.
Sur l'inactivation des enzymes dans les sols (russe).
40. Galstyan (A. Sh.). *Dokl. Akad. Nauk Armyan SSR*, 1963, **37**, 89-93.
Contribution à l'étude de l'activité biologique du sol (russe).
41. Golebiowska (J.), Kobus (J.), Maliszewska (W.), Pacewicz (T.), Sobieszczanski (J.), Stremska (J.). *Symposium sur les méthodes d'étude microbiologique du sol. Pédologie (numéro spécial)*, 1957, 98-103.
Influence du mode de prélèvement et de conservation des échantillons du sol sur son état microbiologique.
42. Grassmann (W.), Mayr (O.), *Z. Physiol. Chem.*, 1933, **214**, 185-210.
Zur Kenntnis der Hefeasparaginase.
43. Haig (D.A.). *Some characteristics of esterase- and urease-like activity in the soil*, 1955, Ph. D. Thesis University of California, Davis.
44. Hoffmann (G.). *Z. Pflanz. Düng. Bodenk.*, 1959, **85**, 97-104.
Verteilung und Herkunft einiger Enzyme im Boden.
45. Hoffmann (G.). *Z. Pflanz. Düng. Bodenk.*, 1959, **85**, 193-201.
Untersuchungen zur synthetischen Wirkung von Enzymen im Boden.
46. Hoffmann (G.). *Recent Progress in Microbiology, Symposia held at the VIII international congress for microbiology, Montreal* 1962, University of Toronto Press, 230-234.
Synthetic effects of soil enzymes.
47. Hofmann (E.), Seegerer (A.). *Naturwissensch.*, 1951, **38**, 141-142.
Die Enzyme im Boden als Faktoren seiner Fruchtbarkeit.
48. Hofmann (E.), Seegerer (A.). *Biochem. Z.*, 1951, **322**, 174-179.
Über das Enzymsystem unserer Kulturböden. I Saccharase.
49. Hofmann (E.). *Z. Pflanz. Düng. Bodenk.*, 1951, **55**, 68-72.
Enzymreaktionen und ihre Bedeutung für die Bestimmung der Bodenfruchtbarkeit.
50. Hofmann (E.), Wolf (E.), Schmidt (W.). *Z. Pflanz. Pflanzenschutz*, 1953, **4**, 177-181.
Vergleich zwichen Enzymgehalt und anderen Eigenschaften verschiedener Kulturböden.
51. Hofmann (E.), Schmidt (W.), *Biochem. Z.*, 1953, **324**, 125-127.
Über das Enzymsystem unserer Kulturböden, II Urease.
52. Hofmann (E.), Niggemann (J.), *Biochem. Z.*, 1953, **324**, 308-310.
Über das Enzymsystem unserer Kulturböden, III Proteinase.
53. Hofmann (E.), Hoffmann (G.), *Biochem. Z.*, 1953, **324**, 397-400.
Über das Enzymsystem unserer Kulturböden. IV Die β-glucosidase.
54. Hofmann (E.), Hoffmann (G.). *Biochem. Z.*, 1954, **325**, 329-332.
Über das Enzymsystem unserer Kulturböden. V α und β-galaktosidase und α-glucosidase.
55. Hofmann (E.), Hoffmann (G.). *Z. Pflanz. Düng. Bodenk.*, 1955, **70**, 97-104.
Über das Enzymsystem unserer Kulturböden. VI Amylase.
56. Hofmann (E.), Teicher (K.). *Z. Pflanz. Düng. Bodenk.*, 1957, **77**, 243-251.
Über das Enzymsystem unserer Kulturböden. VII Proteasen II.
57. Hofmann (E.). *Recent Progress in Microbiology, Symposia held at the VIII international congress for microbiology, Montreal* 1962, University of Toronto Press, 216-220.
The origin and importance of enzymes in soil.

58. IMSENECKI (A.). *Symposium sur les méthodes d'étude microbiologique du sol. Pédologie (numéro spécial)*, 1957, 122-128.
Application des milieux électifs dans la microbiologie du sol.

59. JACKMAN (R.H.), BLACK (C.A.). *Soil Sci.*, 1952, **73**, 117-125.
Phytase activity in soils.

60. KATSNEL'SON (R.S.), ERSHOV (V.V.). *Microbiology*, (Translation of Microbiologiia), 1958, **27**, 81-87.
A study of microflora of virgin and cultivated soils of the Karelian ASSR. II. Biological activity of K. ASSR soils.

61. KAUFFMANN (J.), M^lle BOQUEL (G.). *A. Inst. Pasteur*, 1953, **85**, 365-371.
Action du phosphore sur l'activité des germes nitrificateurs et dénitrificateurs du sol.

62. KEILLING (J.), CAMUS (A.), SAVIGNAC (G.), DAUCHEZ (Ph.), BOITEL (M.), PLANET. *C.R. Acad. Agr.*, 1960, **46**, 647-652.
Contribution à l'étude de la biologie des sols.

63. KISS (I.), BALINT (I.), *Isv. Akad. Nauk. Ser. B.*, 1959, n° 2, 215-220.
Résultats d'une étude de l'accumulation des enzymes dans le sol (russe).

64. KISS (I.). *Talajtan*, Mezögazdasági és Erdészeti Allami Könyvkiado Bukarest, 1958, 495-622.
Talajenzimek.

65. KŒPF (H.). *Z. Pflanz. Düng. Bodenk.*, 1954, **64**, 138-146.
Die biologische Aktivität des Bodens und ihre experimentelle Kennzeichung.

66. KŒPF (H.). *Z. Acker Pflanz.*, 1954, **98**, 289-312.
Untersuchungen über die biologische Activität des Bodens.

67. KŒPF (H.). *Z. Pflanz. Düng. Bodenk.*, 1954, **66**, 262-270.
Experimenteller Beitrag zur Bodenbeurteilung mittels biochemischer Reaktionen. I. Enzymreaktionen und CO2 Ausscheidung bei verschiedenen Böden.

68. KŒPF (H.). *Z. Pflanz. Düng. Bodenk.*, 1954, **66**, 271-277.
Experimenteller Beitrag zur Bodenbeurteilung mittels biochemischer Methoden. II. Enzymreaktionen und CO2 Ausscheidung des Bodens bei einen statistischen Dungungversuch und drei Hauptkulturarten.

69. KOSLOV (K.A.). *Soviet Soil Sci.* (Translation of Pochvovedeniye), 1962, n° 4, 381-387.
Study of the biological activity of soils in Eastern Sibéria.

70. KRASIL'NIKOV (N.A.). *Ber. Wissensch. Biol.*, 1953, **85**, 51.
Die Ausscheidung von Fermenten durch die Wurzeln hoherer Pflanzen.

71. KRASIL'NIKOV (N.A.). *Symposium sur les méthodes d'études microbiologiques du sol. Pédologie (numéro spécial)*, 1957, 129-137.
Le principe écologico-taxonomique dans l'étude de la microflore du sol.

72. LAVERGNE (D.). *A. agr.*, 1955, **6**, 559-567.
Types pédologiques et activité microbienne des sols.

73. LEIBOWITZ (J.), HESTRIN (S.). *Adv. Enzymol.*, 1945, **5**, 87-127.
Alcoholic fermentation of the oligosaccharides.

74. LENHARD (G.). *Z. Pflanz. Düng. Bodenk.*, 1956, **73**, 1-11.
Die Deshydrogenaseaktivität des Bodens als Mass für die Mikroorganismentätigkeit im Boden.

75. MANIL (P.). *B. Inst. agr. Gembloux*, 1955, **23**, 195-212.
Microbiologie et amélioration des sols.

76. MARTIN SMITH (M.). *Nature*, **197**, 361-362.
Uricolytic enzymes in soil.

77. MARTRE-COPPIER (O.). *V^e Congr. int. Sci. Sol, Léopoldville*, 1954, **3**, 39-42.
Essai sur l'évaluation de l'activité des *Azotobacter* dans le sol.

78. MASSART (L.). *The Enzymes*, Acad. Press, New-York, 1950, **1**, 307-342.
Enzyme inhibition.

79. MASTAKOV (S.M.), KULAKOVSKAYA (T.N.), GOL'DINA (S.M.). *Dokl. Akad. Nauk SSR*, 1954, **98**, 141-144.
Activité enzymatique et intensité respiratoire, indices de l'activité biologique du sol (russe).

80. MC LAREN (A.D.). *Soil Sci. Soc. Amer. Proceed.*, 1954, **18**, 171-174.
The adsorption and reactions of enzymes and proteins on kaolinite. II. The action of chymotrypsine on lysozyme

81. MC LAREN (A.D.), RESHETKO (L.), HUBER (W.). *Soil Sci.*, 1957, **83**, 497-502.
Stérilisation of soil by irradiation with an electron beam, and some observations on soil enzyme activity.

82. MC LAREN (A.D.). *Recent Progress in Microbiology, Symposia held at the VIII international congress for microbiology, Montreal* 1962, University of Toronto Press, 221-229.
Enzyme activity in soils sterilized by ionizing radiation and some comments on micro-environments in nature.

83. MONOD (J.), COHN (M.). *Adv. Enzymol.*, 1952, **13**, 67-119.
La biosynthèse induite des enzymes (adaptation enzymatique).

84. MOURARET (M.). *C.R. Acad. Sci.*, 1959, **248**, 2809-2811.
État de l'asparaginase du sol.

85. Moureaux (C.). *M. Inst. sci. Madagascar Ser. D.*, 1957, **8**, 225-241.
Tests biochimiques de l'activité biologique de quelques sols malgaches.

86. Moureaux (C.). *M. Inst. sci. Madagascar Ser. D*, 1959, **9**, 121-199.
L'activité biologique et ses variations dans l'année, en divers sols des Hauts-Plateaux malgaches.

87. Moureaux (C.). *Natural. malgache*, 1956, **8**, 165-177.
La microbiologie dans l'étude des sols.

88. Moureaux (C.). *B. Acad. malgache*, 1959, **37**, 21-26.
Évaluation microbiologique de la fertilité des sols.

89. Nizova (A.A.). *Soviet Soil Sci.* (Translation of Pochvovedeniye) 1960, n° 10, 1111-1116.
Biological activity in soils.

90. Pinck (L.A.), Allison (F.E.). *Soil Sci.*, 1961, **91**, 183-188.
Adsorption and release of urease by and from clay minerals.

91. Pochon (J.), Tchan (Y.T.). *Précis de microbiologie du sol*, Masson & C^ie^, Paris, 1948.

92. Pochon (J.), De Barjac (H.). *Traité de microbiologie du sol*, Dunod, Paris, 1958.

93. Rogers (H.T.). *Soil Sci.*, 1942, **54**, 439-446.
Dephosphorylation of organic phophorus compounds by soil catalysts.

94. Rogers (H.T.). *J. Sci.*, 1942-1943, **17**, 108-110.
The availability of certain forms of organic phosphorus to plants and their dephosphorylation by exo-enzyme systems of growing roots and by soil catalysts.

95. Roush (H.T.), Norris (E.). *Arch. Biochem.*, 1950, **29**, 344-347.
The inhibition of xanthine oxidase by borates.

96. Runov (YE. V.), Terekov (O.S.). *Soviet Soil Sci.* (Translation of Pochvovedeniye), 1960, n° 9, 974-978.
Problem of the catalase activity in certain forest soils.

97. Shumakov (V.S.). *Soviet Soil Sci.* (Translation of Pochvovedeniye), 1960, n° 10, 1026-1068.
Biochemical activity of a dark gray forest-steppe soil under various forest plantations.

98. Simonart (P.), Willemen (R.). *Symposium sur les méthodes d'étude microbiologique du sol. Pédologie (numéro spécial)*, 1957, 98-103.
Influence de la dessication sur le comptage des bactéries dans le sol.

99. Sorensen (H.). *Nature*, 1955, **176**, 74.
Xylanase activity in the soil and the rumen.

100. Spiegelmann (S.). *The Enzymes*, Acad. Press, New-York, 1950, 1, 267-306.
Modern aspects of enzymatic adaptation.

101. Stevenson (I.L.). *Plant & Soil*, 1956, **8**, 170-182.
Some observations on the microbial activity in remoistened air dried soils.

102. Stevenson (I.L.). *Canad. J. Microbiol.*, 1959, **5**, 229-235.
Deshydrogenase activity in soils.

103. Stojanovic (B.J.). *Soil, Sci.*, 1959, **88**, 251-255.
Hydrolysis of urea in soil as affected by season and by added urease.

104. Subrahmanyan (V.). *J. Agr. Sci.*, 1927, **17**, 449-467.
Biochemistry of water-logged soils. Part II, The presence of a deaminase in water-logged soils and its rôle in production of ammonia.

105. Tyner (L.E.). *Soil Sci.*, 1944, **57**, 271-274.
Effects of media composition on the number of bacteria and fungal colonies in Pétri plates.

106. Umbreit (W.W.), Burris (R.H.), Stauffer (J.F.). *Manometric techniques and tissue metabolism*, Burgess, Minneapolis, 1949.

107. Verona (P.L.). *Atti Ist. Bot. Univ. Pavia. Ser.* 5, 1959, **16**, 288-294.
L'attivita catalasica del terreno in funzione dell' « effetto-seme ».

108. Verona (P.L.). *Esper. Ric.*, 1959, 10/11 (n.s.), 195-198.
Influenza dell' « effetto-seme » sull'attivita saccharasica del terreno.

109. Waksman (S.A.). *Soil Microbiology*, J. Wiley & Sons, New-York, 1952.

110. Winogradsky (S.). *Microbiologie du sol, problèmes et méthodes*, Masson & C^ie^, Paris, 1949.

111. Zittle (C.A.), *The Enzymes*, Acad. Press, New-York, 1950, **1**, 929-933.
Hydrolysis of acid amides and amino acid amides.

112. Zittle (C.A.). *Adv. Enzymol*, 1953, **14**, 319.
Adsorption studies of enzymes and other proteins.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

LA TECHNIQUE DES ANTICORPS FLUORESCENTS
ET SES APPLICATIONS A LA MICROBIOLOGIE

VU
Le Président de Thèse
Jean JACQUET

VU
Le Doyen de la Faculté des Sciences
Noël LOZAC'H

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Caen, le 13 mai 1965
Pour le Recteur
Le Vice-Président du Conseil de l'Université délégué
Michel DE BOUARD